

制癌剤含有磁性エマルション の調製と癌化学療法への応用

甲第3号

秋 元 雅 之

目 次

総論の部

緒 言	1
第 1 編 磁性エマルジョンの調製と安定性におよぼす物理化学的因子の検討	3
第 1 章 オレイン酸エマルジョンの乳化安定性に対するタンパク質と pH の影響	3
第 1 節 オレイン酸エマルジョンの調製	4
第 2 節 相分離過程の比較	5
第 3 節 粒子径および粒子数の測定	7
第 4 節 表面張力の測定	8
第 5 節 粘度の影響	9
第 6 節 オレイン酸とタンパク質の相互作用	12
第 7 節 考 察	13
第 2 章 磁性エマルジョンの調製	15
第 1 節 磁性液の調製法	15
第 2 節 磁性エマルジョンの調製	16
第 3 章 磁性エマルジョンの安定性に関する検討	19
第 1 節 沈降容積の測定	19
第 2 節 磁性エマルジョンの粒子数の測定	20
第 3 節 密度の測定	21
第 4 節 粘度の影響	22
第 5 節 考 察	23
第 2 編 磁性エマルジョンの磁気応答性	25
第 1 章 磁性エマルジョンの生体外磁気応答性の検討	26
第 1 節 磁性エマルジョンの磁気応答性	26
第 2 節 血管を想定した flow モデルを使用した磁性エマルジョンの磁気誘導	28

第2章	磁性エマルジョンによる臓器選択性の増強	30
第1節	オレイン酸エマルジョンの生体内分布	31
第2節	オレイン酸ベースの磁性エマルジョンの生体内分布	32
第3節	オレイン酸エチルベースの磁性エマルジョンの生体内分布	34
第4節	マグネタイトの分布に関する組織学的検討	36
第5節	考 察	36
第3編	磁性エマルジョンの投与剤形としての基礎的検討	41
第1章	磁性エマルジョンからの薬物放出とニトロソウレア系制癌剤の保護、安定化におけるエマルジョンの有用性	42
第1節	エマルジョンによるニトロソウレア系制癌剤の安定化	43
第2節	磁性エマルジョンからの薬物放出	47
第2章	磁性エマルジョンによる抗腫瘍効果	49
第1節	標的部位における薬物濃度の測定	49
第2節	Me-CCNU 含有磁性エマルジョンの抗腫瘍効果	55
第3節	ACNU 含有磁性エマルジョンの抗腫瘍効果	56
第4節	磁性エマルジョンの毒性	57
第5節	考 察	58
結 論		59
謝 辞		60
実験の部		
第1編	実験の部	61
〔Ⅰ〕	オレイン酸エマルジョンの調製法	61
〔Ⅱ〕	オレイン酸エマルジョンの安定性の評価法	61
〔Ⅲ〕	磁性液の調製法	62
〔Ⅳ〕	磁性エマルジョンの調製法	63
〔Ⅴ〕	磁性エマルジョンの安定性の評価法	63

第2編	実験の部	64
〔Ⅰ〕	磁性エマルションの磁気応答性	64
〔Ⅱ〕	磁性エマルションの生体外磁気誘導法の検討	64
〔Ⅲ〕	磁性エマルションの生体内分布測定法	67
〔Ⅳ〕	マグネタイトの分布に関する組織学的検討法	71
第3編	実験の部	73
〔Ⅰ〕	ニトロソウレアの安定性の測定	73
〔Ⅱ〕	磁性エマルションからの薬物放出量の測定	76
〔Ⅲ〕	Me CCNU の肺内濃度測定法	77
〔Ⅳ〕	ACNU の生体内濃度測定法	77
〔Ⅴ〕	抗腫瘍効果測定法	81
参考文献		83

総論の部

緒言

癌の臨床治療において化学療法は、外科的、物理学および生物学的な治療と並んで、重要なアプローチの一つである。もちろん、早期発見と外科手術が今日、治療の中心となっているのは言うまでもないが血液癌、手術的処置が困難である末期癌患者の対症処置や再発防止において、化学療法の果たす役割は富みにその重要性を増してきている¹。しかしながら、血液癌を除き、制癌剤による治療手段は多くの癌に対して今だに充分満足すべき治療成績が得られず、二次的治療法にとどまっているのが現状である。血液癌の場合、血液成分が癌化しているのであるから、血管内に、制癌剤を注入することにより、少なくとも初期の治療効果としてかなりの成績が得られるようになった²。従って、化学療法の目下の主目標は消化器癌やその他の臓器癌等の固形癌をいかに効果的に治療に導くかにある。臨床に使用されている制癌剤はその多くが腫瘍細胞だけでなく正常細胞の生存にも影響を与え、このことが化学療法の有用性に著しく制限を加えていることは周知の事実である³。

化学療法の治療効率を高めるためには、1)癌特異性のある制癌剤を見いだすか、2)現在ある制癌剤を投与後可能な限り腫瘍部位に局在させることである。前者については、現在広く研究開発が進められているが、目下のところ見い出されていない。そこで、後者が多くに注目されることになる。制癌剤の分布を投与法の改善、薬剤、製剤学的修飾によって腫瘍部位に可能な限り局在させることができるならば、効果的な治療が期待できるばかりでなく、宿主に対する副作用をも軽減することが可能となる。薬物担体はこうした化学療法の欠点を補い、効果的な治療を行うための有力な武器として検討されてきている^{4, 5}。

癌化学療法における薬物担体の利用に関しては現在までに数多くの研究がなされ、本法が薬物の保護、安定化、副作用の軽減、組織到達性の増加および特効化等に有効な手段であることが報告されている⁶。担体としてはリポゾーム（脂質小胞体）⁷、アルブミン小球体⁸、高分子複合体⁹およびエマルション¹⁰などが利用されているが、脈管内投与によるそれらの標的性は生体の細網内皮系の機能やその他生体の特異的働きに負うところが大きく、種々の標的部位に制癌剤を転送、局在化させることは容易なことではない¹¹。

近年、アルブミン小球体に鉄フェライトを含有させ、磁石によって動物の標的部位に磁場を発生させ、静脈内投与した制癌剤含有磁性アルブミン小球体を磁場発生部位に局在化させることが、制癌剤の体内分布を修飾する上で非常に有用であることが明らかとなった¹²⁻¹⁴。また、生体内親和性物質や特異抗体を含有した担体が特異的に臓器や細胞に集中

することも確認されるようになった。^{15, 16}しかし、エマルジョン製剤における特異的な標的性はリンパ指向性以外にはほとんど報告がなく、¹⁷その製剤上の安定性と共に臨床応用に著しい制限を加えている。¹⁸化学療法におけるエマルジョンの使用は優れた組織内滞留性および浸透性や徐放性による病巣への直接効果の増強などの有用面があるが、その臨床使用が著しく少ないのはこのような理由によるものである。¹⁹

そこで、著者は生体外からの磁気誘導によって病巣部位にエマルジョンを局在化させ、集中的かつ効果的な化学療法を行うために、油相に磁性液 (Magnetic fluid) を用い、乳化剤に比較的毒性が低く、天然高分子であるタンパク質の界面活性作用を利用して水中油型 (o/w 型) の制癌剤含有磁性エマルジョンを開発した。²⁰以下、三編にわたりその安定性と投与剤形としての有用性および制癌効果について論述する。²¹

第1編 磁性エマルションの調製と安定性におよぼす物理化学的因子の検討

現在、癌化学療法に用いられている薬物は効力、副作用、持続性、製剤適性などの面で理想的な治療薬というのには不十分であるが、特に特異性の点で著しい欠点を有している。²²そこで、物理的手段によって、薬物を薬物担体中に封入し、腫瘍部位にまで薬物を誘導して、そこで遊離薬物を持続的に放出するような剤形を設計することは治療効果を増強する上で有力な手段といえるものである。⁶

エマルションは薬剤学的な領域で広く応用が期待されているが、安定性の低さや標的性を制御することの難しさなどから、製剤としての形態に制限のあるのが現状である。¹⁸そのため、安定なエマルションの調製に影響をおよぼす物理化学的因子の検討と安定性の評価は重大な意義があると考えられ、粒子数、相分離過程、表面張力、界面張力、転相温度など種々の角度から検討が試みられている。²³⁻²⁵

そこで、磁性エマルションの調製に影響する物理化学的因子を検討するとともに、その安定性を評価して調製条件を詳細に調べた。

第1章 オレイン酸エマルションの乳化安定性に対するタンパク質とpHの影響

エマルション系は医薬品、化粧品および食品など領域において広く用いられてきているが、この系は熱力学的に不安定な系である。そのため、系を安定化するため乳化剤を添加する必要が起こる。²⁶近年、製薬工業や食品工業において高分子によるエマルションの安定化は重要な課題となりつつある。すなわち、製剤加工の過程で種々の水溶性ならびに脂溶性成分を混合する必要性は頻繁に生じる。エマルションの安定化に古くより界面活性剤が用いられてきたが今日、大部分の合成界面活性剤は医療上使用できなくなっており、古くからエマルション生成に利用されてきたある種の天然高分子の界面活性作用に注目することは、かなり実用的意義があると考えられる。²⁸また、化学療法に使用される薬物担体としてその調製過程においてもエマルションという形態の重要性は高まっているが、その安定性と安全性は臨床面からも重要な検討課題である。²⁹

そこで、磁性エマルションの調製には広く自然界に存在するタンパク質を乳化剤として利用することにした。²⁹タンパク質は複雑な構造の高分子であり、その乳化剤としての機能はイオン環境によって大きく影響を受ける。それ故、タンパク質で乳化したエマル

ションの安定性に影響を及ぼす因子のうちで、pHは最も重要な因子の一つとして考えなくてはならない。従って、最も適当なタンパク質乳化剤と至適pHの選択は基本的に重要な問題である。³⁰⁾

本章においては、安定な磁性エマルジョンを調製するために必要とされる乳化剤の決定に関係する実験の1つのモデルとして、乳化能を有する代表的なタンパク質であるBSA、ゼラチンおよびカゼインを乳化剤とし、またオレイン酸（磁性エマルジョンの分散相として使用する磁性液のベースオイルの1つである。）を分散相に用い o/w型エマルジョンを調製した。このエマルジョンを安定性の観点から、その分散状態について検討して磁性エマルジョンの調製条件に影響する因子について考察を行った。

第1節 オレイン酸エマルジョンの調製

生体に適用可能な磁性エマルジョンの組成を決定するための予備の実験として、磁性液のベースのうちの一つであるオレイン酸を使用して乳化タンパク質と調製pHのエマルジョン安定性に対する影響を検討した。Table 1はエマルジョンの組成ならびに乳化剤として用いたタンパク質を示したものである。乳化剤としては牛血清アルブミン(BSA)、ゼラチンおよびカゼインを使用し、それぞれ1%の濃度になるように、イオン強度0.1、pH3～9の等張緩衝液で連続相（水相）溶液を調製した。分散相（油相）濃度は20%とし、乳化はUltra-Turraxを使用し、37℃、10000rpm、5分間で行った。調製後、エマルジョンは安定性を評価するために相分離過程、表面張力、粒子数およびレオロジーの観点から検討を加えた。なお、以下に詳述する実験はすべて37℃の温度条件で行った結果である。

TABLE 1
COMPOSITION OF O/W EMULSION AND ISOELECTRIC POINT OF
PROTEIN MATERIALS

o/w Emulsion		Protein materials
Water phase	6 ml	1. Bovin Serum Albumin(BSA)
Protein	60 mg	M.W. 69000 pI 4.9
Distilled water	q.s.	2. Casein
Oil phase	1.5 ml	M.W. 375000 pI 4.6
Oleic acid	1.5 ml	3. Gelatin
Total volume	7.5 ml	M.W. 100000-250000
		pI 4.5-5.0

第 2 節 相分離過程の比較

調製されたエマルジョンの安定性は相分離過程から視覚的に観察することによって評価し、乳化に使用したタンパク質の種類およびpHとの相関を検討した。pHは 3.0から9.0の間で検討した。BSA、ゼラチンおよびカゼインを使って調製したエマルジョンの放置時間に対する相分離変化はそれぞれFig. 1 – 3 に示した。相分離速度はタンパク質の種

類およびpHによる影響が非常に大きいことがわかった。

BSA で安定化されたエマルジョンでは、分離速度はpH5、3、7、9の順に大きく、pH3および5では、油滴の凝集性が強く、速やかに二相に分離した(Fig.1)。

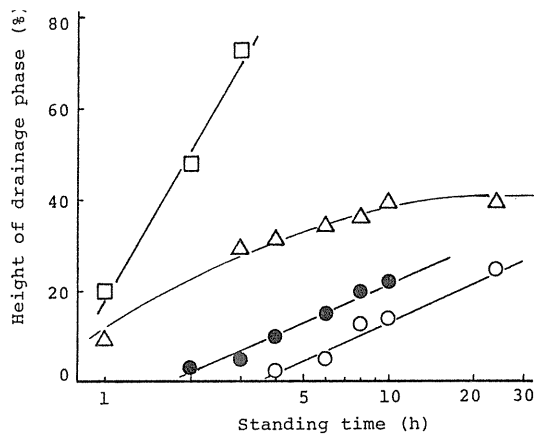


Fig. 1 Effect of pH on the Relationship between Height of Drainage Phase and Standing Time for BSA-Stabilized Emulsions

(Δ) pH 3, (\square) pH 5, (\bullet) pH 7, (\circ) pH 9

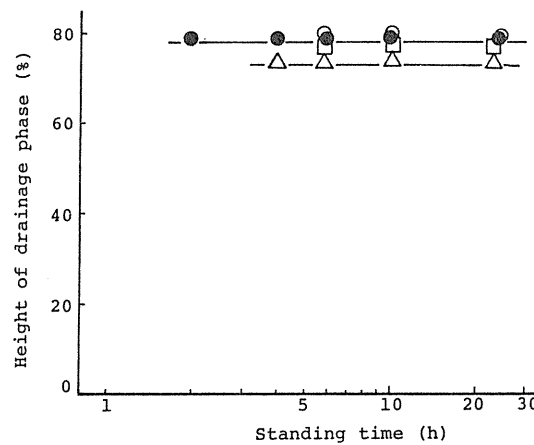


Fig. 2 Effect of pH on the Relationship between Height of Drainage Phase and Standing time for Gelatin-Stabilized Emulsions

Symbols; as in Fig. 1.

この傾向は特にpH5において顕著であり、調製直後から急速な分離が観察された。一方、pH7と9ではこうした傾向は見られず、分離はゆっくりと進行し、安定なエマルジョンであることを示した。これらの結果から、水相のpHがBSAの等電点(pH_I)に近づくにつれて、排液現象が著しく大きくなりエマルジョンの安定性が減少するものと推測された。Fig.2 はゼラチンで乳化したエマルジョンであるが、その安定性は非常に悪く、攪拌をやめると同時に急激なクリーミングを生じ、二相に分離した。結局、ゼラチンを使用したエマルジョンでは調製pHの如何にかかわらず不安定であり、良好な分散を得ることは困難であった。

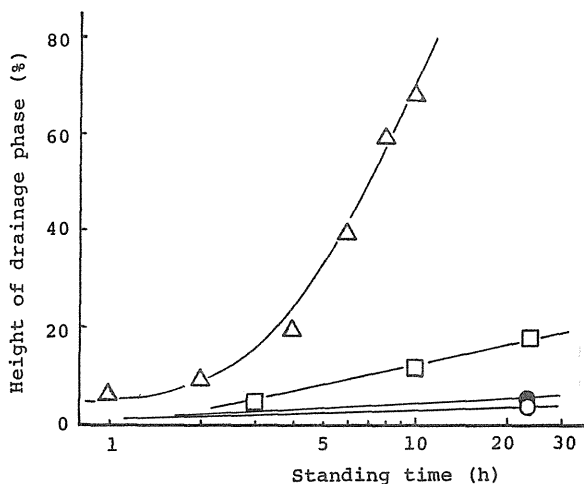


Fig. 3 Effect of pH on the Relationship between Height of Drainage Phase and Standing Time for Casein-Stabilized Emulsions
(Δ) pH 6.5, (\square) pH 7, (\bullet) pH 8, (\circ) pH 9

カゼインで調製されたエマルジョンの相分離速度はpHが増加するにつれて減少する傾向が観察された。特に、pH7以上では安定性が著しく増加し、pHが分散状態に密接に関与していることが示唆された。しかし、pHが7以下では安定性が悪く、排液効果が調製直後も大きいことが認められた (Fig. 3)。

以上の結果より、BSAあるいはカゼインで調製されたエマルジョンは水相がpH9.0のものが最も排液効果が少なく、三種のタンパク質の中でpH9におけるカゼインの乳化力が最も大きいことが観察された。

第3節 粒子径および粒子数の測定

乳化タンパク質の分散性能に関する知見ならびにエマルジョンの分散状態に関して詳細な情報を得るために、コールターカウンター法によりエマルジョンの粒子数と粒子径を測定した。Fig. 4 はエマルジョンの粒子数に対するpHの影響を示したものである。

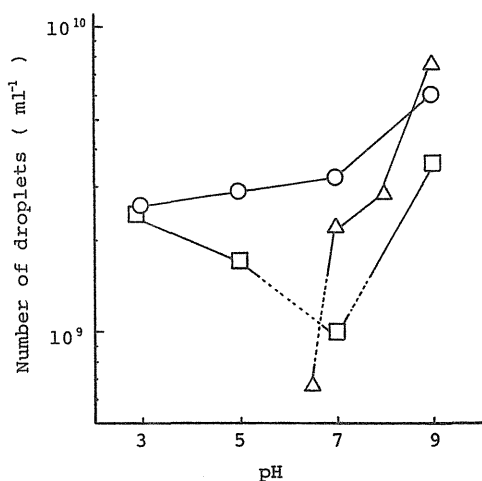


Fig. 4 Effect of pH on the Number of Droplets for Protein-Stabilized Emulsions
(○) BSA, (□) Gelatin, (△) Casein

粒子数の測定はエマルジョンの安定性を定量的に評価する方法の一つであり、調製直後の試料を測定に供した。

カゼインあるいはBSAで乳化したエマルジョンの粒子数はpHが増加するとともに増加するのが観察された。一方、ゼラチンを用いたエマルジョンではpH7で粒子数が最も少なく、その前後のpHでは増加することが観察された。三種のエマルジョンともpH9で粒子数が最高となり、このpHにおける乳化力が最も強力であることが推察された。しかしながら、pH7以下でカゼインを使用した時にはエマルジョンが形成できずに不安定な凝固物を生じた。同様な現象はpH7でゼラチンを用いた時にも起り、この時にも不安定なゲルの形成が観察された。

Fig. 5 は粒子径のpH依存性を示したものである。粒子径の最小値はBSAに関してpH7で、カゼインおよびゼラチンではそれぞれpH9で観察された。実験範囲内での至適pHにおいては、カゼインで調製されたエマルジョンの粒子径がBSAあるいはゼラチンで調製されたものよりも小さく、先に述べた粒子数の結果と考え合わせると、粒子が微細で粒子数の多いカゼインの乳化作用によって得られる分散が最もすぐれていた。

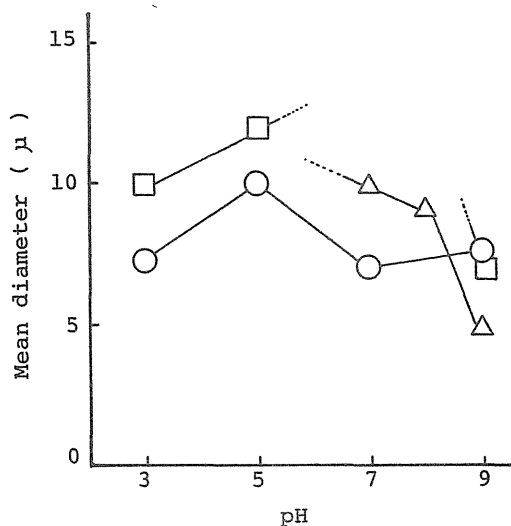


Fig. 5 Effect of pH on the Size of Droplets for Protein-Stabilized Emulsions
(○) BSA, (□) Gelatin, (△) Casein

タンパク質分子はエマルションの表面に吸着層を形成し、その電氣的反発力によって液滴間の凝集を妨げていると考えられている。そのため、実効荷電が零となる等電点付近において、真に可溶なタンパク質であるBSAで安定化したエマルションの粒子径が最大となったり、カゼインのように凝固物を形成することや等電点から離れたpHで安定性が増大することが認められた。しかし、ゼラチンの場合、等電点と乳化力との関係はこの測定法では明確にはできず、今後さらに検討が必要と思われる。

第4節 表面張力の測定

タンパク質の添加によって乳化されたエマルションの安定性の機構を詳細に検討するために、連続相溶液の表面張力を測定した。

Fig. 6は表面張力のpH変化を示したものである。表面張力に関しては、測定したpH範囲において、また三種のタンパク質の間に顕著な差は認められなかった。なお、溶媒として使用された等張緩衝液の表面張力は37℃において72.5dyne/cmであった。

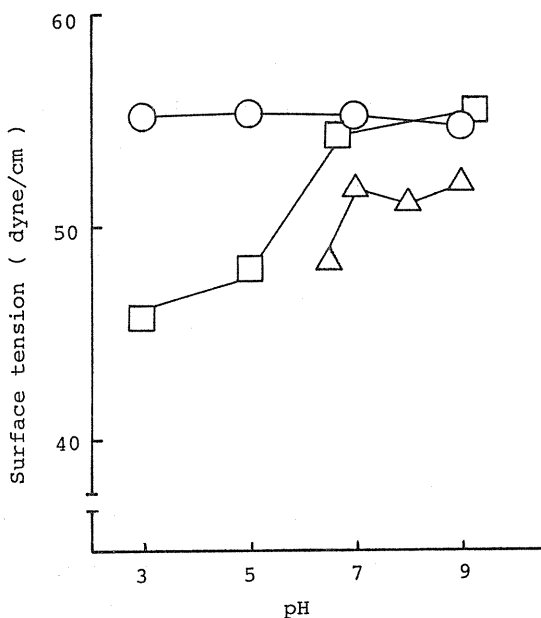


Fig. 6

Effect of pH on the Surface Tension of Aqueous Solutions Containing Protein. Symbols; as in Fig. 5.

第5節 粘度の影響

エマルションの粘度は分散相の破壊 (breaking) によって変化するばかりでなく、BSAゼラチンあるいはカゼインのような添加物の存在によって生じる油滴の分散状態によっても変化すると考えられる。一般に、粘度が高くなれば、エマルションの安定性は増加するとされている。従って、連続相の粘度の増加によるエマルションの粘度の相対的増加はある程度安定性を変える可能性のあることを示唆している。

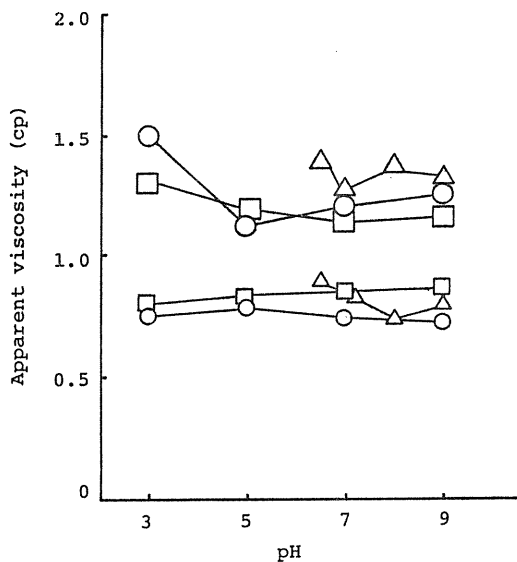


Fig. 7

Effect of pH on the Apparent Viscosity of Continuous Phase alone and Emulsions
(○) BSA, (□) Gelatin, (△) Casein,
(○) BSA-stabilized emulsion
(□) Gelatin-stabilized emulsion
(△) Casein-stabilized emulsion

Fig. 7 はタンパク質を含んだ連続相の粘度に対するpHの影響と調製されたエマルションの粘度を示したものである。各試料の粘度はウベローデ型の毛細管粘度計を使用して測定された。標準としては37℃における蒸留水を用い、その時の粘度は0.675 cpであった。Fig. 7 から明らかなように、それぞれの連続相の粘度は常に低い値であり、タンパク質の種類にかかわらず、pH 3 から 9 の範囲内ではほとんど同様な値であった。さらに、それら連続相を用いて調製したエマルションの粘度についても著しい差は見い出せなかった。すなわち、エマルションの安定性はこの場合、連続相の粘度とはあまり関係がないものと考えられる。

エマルションの粘性挙動を比較する場合、ある一点でのずり速度で粘度を決定することは誤った結論に到達することがあり、粘度の測定はずり速度を幅広くとって行われることが望ましいとされている。そこで、調製直後のエマルションの粘度に対する添加タンパク質とpHの影響を試験する目的でずり速度を0から180 sec^{-1} まで変化させたときの粘性挙動を検討した。Fig. 8～10は三種のタンパク質で調製したエマルションのレオグラムであり、オレイン酸のレオグラムも対照として示した。

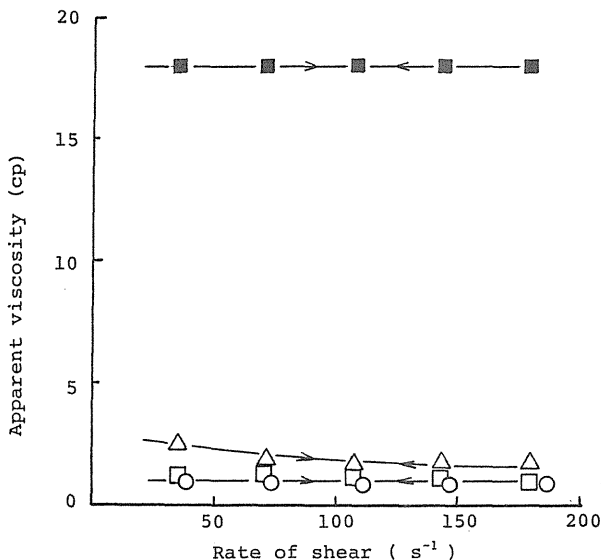


Fig. 8 Rheograms of BSA-Stabilized Emulsion Prepared at Different pH Values
 (■) Oleic acid, (Δ) pH 3, (\square) pH 7, (\circ) pH 9.

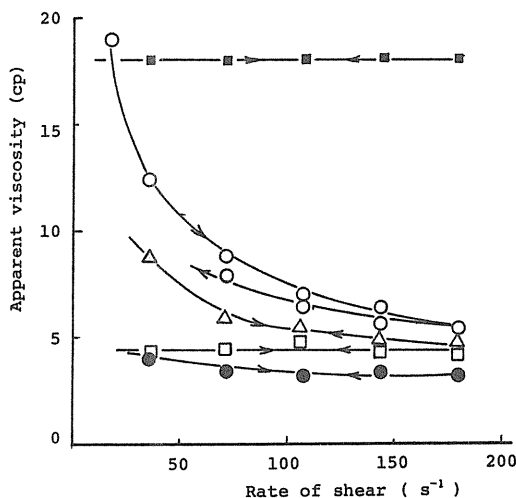


Fig. 9 Rheograms of Gelatin-Stabilized Emulsion Prepared at Different pH Values
(■) Oleic acid, (△) pH 3, (□) pH 5, (○) pH 7
(●) pH 9

Fig. 8 は BSA で乳化したエマルジョンの相対粘度に対してずり速度をプロットしたものであり、pH7 および pH9 のエマルジョンの見掛けの粘度とずり速度との間には直線関係の成立するニュートン流動を示した。同様に、オレイン酸は単純なニュートン流動であった。o/w 型エマルジョンは比較的低い分散相濃度 ($\phi = 0.2$) から成っているためにニュートン流動を示したと考えられる。この Fig. 8 の結果は分散相の容積比が 0.2 以下であるような比較的分散相濃度の低いエマルジョンで、なおかつ、ずり速度の低い範囲内においてはニュートン流動が得られるという理論と一致しているものと考えられる。

ゼラチンで安定化したエマルジョンに関して、流動曲線は pH5 のエマルジョンを除いて、すべてが水平なプロットは得られなかった。見掛けの粘度は最初に減少し、次にずり速度の増加にもかかわらず水平となる傾向を見せた。pH7 のエマルジョンはヒステレシス効果 (hysteresis effect) が認められ、pH5 のエマルジョンと比較すると、ずり速度 18sec^{-1} で約 4 倍粘度が高かった。

チキソトロピー (thixotropy) は物質内に有限構造が形成されることによって生じる。それ故、この現象は油滴粒子が互いに結合し、そして粒子間に液体を取り込んだゲル状の状態となることや転相 (phase inversion) の生じたことを示唆しているとして解釈できるかも知れない。

カゼインで調製されたエマルジョンに関して、pH7、8 あるいは 9 の試料はニュートン流動を示した (Fig.10)。一方、pH6.5 のエマルジョンは低いずり速度においても、非ニュートン流動を示した。Fig.10において、ヒステレシス効果はチキソトロピックエマルジョンであった pH6.5 の試料で観察され、そのエマルジョンは他のエマルジョンよ

り 40sec^{-1} のずり速度で、9～10倍粘度が高かった。

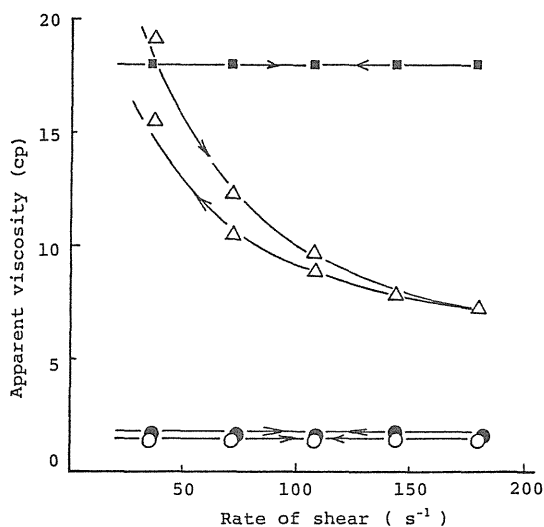


Fig. 10 Rheograms of Casein-Stabilized Emulsion Prepared at Different pH Values
(■) Oleic acid, (Δ) pH 6.5, (\bullet) pH 8, (\circ) pH 9

Fig. 8-10において見られるように、o/w型エマルジョンの分散状態は添加タンパク質の種類と水相のpHに大きく影響を受け、その結果をo/w型エマルジョンの流動曲線に反映したものと考えられる。一般に、安定なエマルジョンはニュートン流動であり、一方、不安定なエマルジョンはチキソトロピーを示した。この結果はFig. 1-5の安定性の結果と1、2の点を除きよく一致している。

第6節 オレイン酸とタンパク質の相互作用

タンパク質溶液とオレイン酸とを混合するとき、o/w型のエマルジョンが得られる。このうちのタンパク質量のいくらかは水相から移行し、形成されたエマルジョンの油-水界面に吸着する。そこで、吸着タンパク質量を水相中のタンパク質濃度の減少程度を測定することによって定量した。

Fig. 11は一定量のオレイン酸に吸着したタンパク質量をpHに対してプロットしたものである。吸着タンパク質量は水相のpHとタンパク質の種類に依存して変化した。安定性との相関は認められなかった。

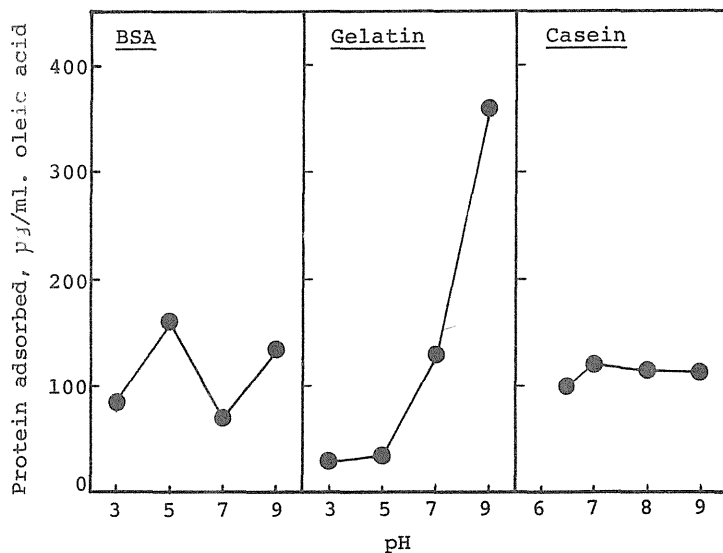


Fig. 11 Effect of pH on the Adsorption of Protein at Oil-Water Interface

第 7 節 考 察

o/w 型のエマルションの安定性に対する pH の影響は三種類のタンパク質に関して試験された。これらエマルションの分散状態は水相の pH の変化によって著しく変わることが認められた。²⁹ 一般に、タンパク質で乳化されたエマルションはそれぞれのタンパク質の物理化学的性質すなわち、化学組成、分子配座、分子量、溶解度ならびに純度などによって影響を受けることが知られている。³⁰ タンパク質はそれ自体、荷電を有した一種のコロイド粒子であり、純度の良いタンパク質は固有の等電点をもつためにイオン環境によって、その性質に変化が生じることが考えられる。すなわち、等電点付近ではタンパク質分子は一般に、その実効荷電を減じ、多かれ少なかれ相互に凝集する傾向にある。それ故、その pH でタンパク質が真に可溶性であるならば、エマルションの最大粒子径は等電点付近の pH で調製した時に観察される。BSA で安定化したエマルションではこのような現象が認められ、等電点に接近するにつれて平均粒子径を増加し、同時に凝集速度をも急激に増加した (Fig. 2、5)。エマルションの安定性は粒子径の相違からだけでは評価できないが、この分散相濃度 (20%) では粒子径の微細なもの程、安定性がすぐれているように思われた。

多くのタンパク質に関して、等電点においてはその実効荷電が零となり、粒子間の電気的反発力を失うことにより溶解度は最小となることが考えられる。Crenwelge らは溶解度の高いタンパク質は乳化力が大きいことを見出した。³¹ すなわち、溶解したタンパ

ク質のみが有効な乳化剤として作用することが可能であり、それがエマルションの油水界面に安定な単分子層を形成し、その電氣的反発力によって液滴間の凝集を防止するように働くと考えられている。この傾向は特に乳タンパク質に強く現われることが知られている。カゼインは水に比較的難溶で³⁰、等電点においては容易に凝固物 (coagulum) を生成するが、アルカリ溶液中では易溶となり、溶解度はpHと共に増加する。そのため、乳化力はpH9で最高であり、一方pH7以下では乳化力が極端に低下した (Fig. 3、4)。このように、pHは乳化油量に関係するばかりでなく、タンパク質の溶解度に関係し、そのため間接的に乳化力に影響を及ぼすと考えられる。低pH側では、タンパク質の等電点に接近するにつれて溶解度は低下し、結局、乳化力減少の原因となることは多くのタンパク質で観察されている。これらの事実から、タンパク質で調製されたエマルションは水相のpHを等電点から離れたpHとすることで安定性が增大する可能性を示している。しかしながら、ゼラチンで調製したエマルションの分散状態は等電点 (pH 4.5-5.0) に強く依存するような現象は観察できなかった。ゼラチン溶液は低温では不安定であり、1%以下の濃度で使用する時、そのエマルションはクリーミング (creaming) が激しく、それ以上の濃度ではゲル化することが知られている³²。これらの系ではカゼインやBSAの乳化系よりも不安定であるのが認められた (Fig. 2)。

エマルションの安定性に及ぼす因子として、他には油水界面におけるオレイン酸イオンの存在も関係していると考えられる。水相の塩基性が増加するにつれてオレイン酸イオン濃度も増加し、生じたオレイン酸ソーブが乳化剤として作用することも考えられる。しかし、この系におけるオレイン酸ソーブのエマルションの安定性に対する寄与は本実験からは定かではない。

また、界面に吸着したタンパク質量は分散状態を決定するとされているが、Fig.11では安定性との相関は認められなかった。この原因には、攪拌および乳化時におけるタンパク変性や油滴中に分散した微細な不溶性タンパク質粒子が遠心分離などの実験操作後、油水界面に取り込まれた結果と考えられる³⁴。

タンパク質乳化剤の性質を予測するのは通常の界面活性剤の場合よりも難しく、しかも変性などにより性質が変化したり、陰イオン、陽イオンの共存や多価イオンとの相互作用のために等電点の意義が失われたりする場合も多い²⁸。

磁性液のベースの一つであるオレイン酸を用いたエマルションについては、以上の相分離、粒子径および粒子数、表面張力、粘度、さらにはオレイン酸とタンパク質との相互作用に関する実験結果を総合的に評価すると、pHが7以上でカゼインを乳化剤に用いたときが、最も安定性が良かったので、以後の磁性エマルションの調製にも使用することとした。

第2章 磁性エマルジョンの調製

磁性エマルジョンの調製には磁性流体を用いた。磁性流体は液体としての流動性と磁性体としての磁気特性を併せもつ新しい工業材料として注目を浴びており、現在、多方面に利用されつつある。³⁵ マグネタイトコロイドの粒子径は $100-200 \text{ \AA}$ であり、四三酸化鉄粒子の表面にオレイン酸ナトリウムが単分子吸着し、通常はケロシン等の無極性溶媒中に分散している。³⁶ 従来、薬物担体の磁気誘導の目的で小球体やマイクロカプセルに磁性粉末や磁性流体を含有させた例はあるが、¹³ その目的のために磁性粉末を含んだエマルジョンを調製するのは非常に難しい問題が多い。それは磁性粉末を分散する溶媒としては無極性炭化水素が多く用いられるために生体への投与に際して大きな障害となるからであり、また、植物油やエステル類を分散媒として使用した場合でも、磁性粒子は長時間、均一に分散できずに凝集、合一が進行し、固液分離を生じてエマルジョン化が不可能になることも多いからである。これらの問題点を改善して、磁性粒子と制癌剤を含有した油滴を磁気によって分離することなく磁場に捕捉し、効果的な治療効果が期待できるような担体としての磁性エマルジョンを設計するのには、生体に投与の可能な溶媒で油相が構成され、しかも、ある程度は安定であり、磁場を適用しても固液分離を起さないような磁性流体の存在が必要になる。

磁性エマルジョンの分散相である磁性液は界面活性剤として、磁性粒子に対して吸着性の強い不飽和脂酸が用いられている。そのため、分散媒はこれらと“なじみ”が良いこと、つまり化学的に類似した物質が好ましいとされる。³⁷ そこで本研究ではオレイン酸ナトリウムを吸着被覆した磁性粉末（マグネタイト）を湿式法によって調製し、その分散媒として生体内投与が可能で、しかも比較的マグネタイトへの親和性の良いと考えられるオレイン酸およびオレイン酸エチルを選定して二種類の磁性液を作製し、さらに第1章において検討した条件のもとでそれらをエマルジョンとした。

以下に、その詳細な調製方法およびエマルジョンの処方と性質について論述する。²¹

第1節 磁性液の調製法

磁性エマルジョンは分散相にオレイン酸ベース、あるいはオレイン酸エチルベースの磁性液を用いて調製した。磁性液の調製方法としては下飯坂らの湿式法を一部変更した方法を採用した。³⁸

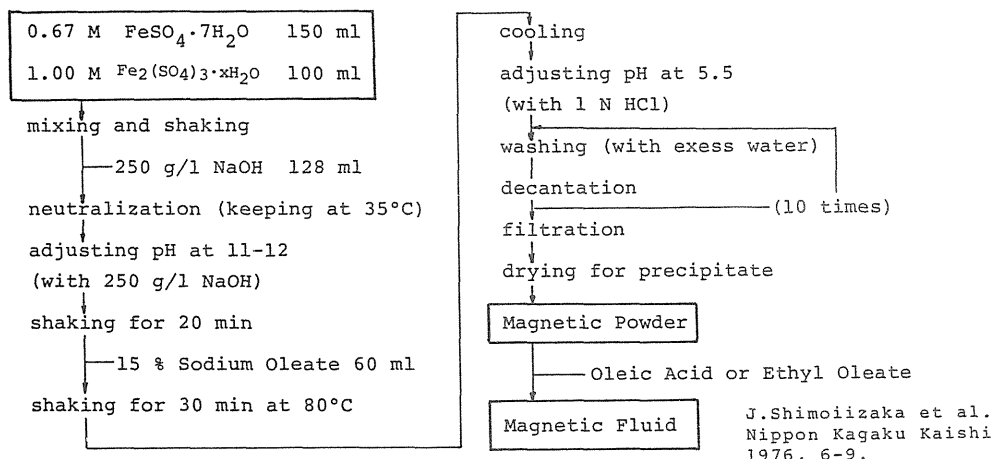


Chart 1. Schematic Diagram of Preparation of Magnetic Fluid

調製法の概略をChart 1 に示す。始めに、硫酸第一鉄と硫酸第二鉄の溶液を混和、攪拌後、水酸化ナトリウムを加えて、pH11~12となるように調節した。そこにオレイン酸ナトリウムを添加してマグネタイト粒子への吸着反応を行い、さらに完全にこの反応が進行するように反応温度を80℃以上に維持した。冷後、塩酸を滴下してpHを6-4に下げてから、大量の蒸留水を加えて副生成物である芒硝を洗浄、除去した。生成したマグネタイト（磁性粉末）は濾過した後、凍結乾燥され、粉末をオレイン酸あるいはオレイン酸エチルに分散させて、それぞれの磁性液を得た。

第2節 磁性エマルションの調製

Table II に調整を行なった二種類の磁性エマルションの処方を示す。オレイン酸ベースの磁性エマルションとオレイン酸エチルベースの磁性エマルションとの処方の差異は磁性液中のマグネタイト濃度にあり、最も磁性液の安定性の良い濃度を選択してマグネタイト含量を決定した。その他の条件は第1章のオレイン酸エマルションの処方と同様とした。なお、乳化には最も優れた分散が得られたカゼインを乳化剤として用い、水相のpHは8に合わせて調製した。

Table II Composition of Magnetic Emulsion Formulations

Oleic acid-based magnetic emulsion	
Water phase	6.0 ml
Casein	60 mg
Distilled water	q.s.
Oil phase (Oleic acid-based magnetic fluid)	1.5 ml
Magnetite	472 mg
Oleic acid	q.s.
Total volume	7.5 ml
Ethyl oleate-based magnetic emulsion	
Water phase	6.0 ml
Casein	60 mg
Distilled water	q.s.
Oil phase (Ethyl oleate-based magnetic fluid)	1.5 ml
Magnetite	347 mg
Ethyl oleate	q.s.
Total volume	7.5 ml

磁性エマルジョンの形状はFig.12に模式図として示す。エマルジョンの油相である磁性液はオレイン酸ナトリウムが単分子層吸着した直径 $100 - 150 \text{ \AA}$ のマグネタイトコロイドがオレイン酸またはオレイン酸エチルに懸濁したものである。通常、エマルジョンはマグネタイトが油滴に含まれるために色は黒色から黒褐色を呈しているが、マグネタイトの優劣によって色彩は微妙に変化する。一般には良質のマグネタイト程黒色が強いと考えられている。これらはいずれも磁気に良く感応し、磁性流体として挙動する。

Fig.13は磁性エマルジョンの顕微鏡写真を示したものである。二種のエマルジョンの粒度分布は $1 - 20 \mu\text{m}$ の範囲内にあり、平均粒子径はオレイン酸系で $6.4 \mu\text{m}$ 、オレイン酸エチル系では $5.0 \mu\text{m}$ の乳濁液であった。

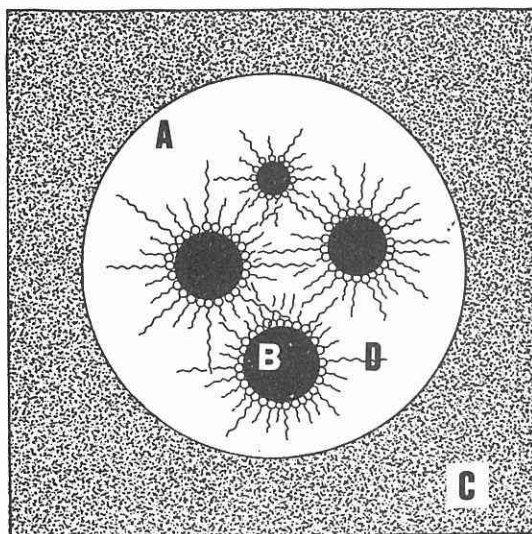


Fig. 12 Model of Magnetic Emulsion

- (A) Oleic Acid or Ethyl Oleate
- (B) Magnetite
- (C) Aqueous Phase
- (D) Sodium Oleate

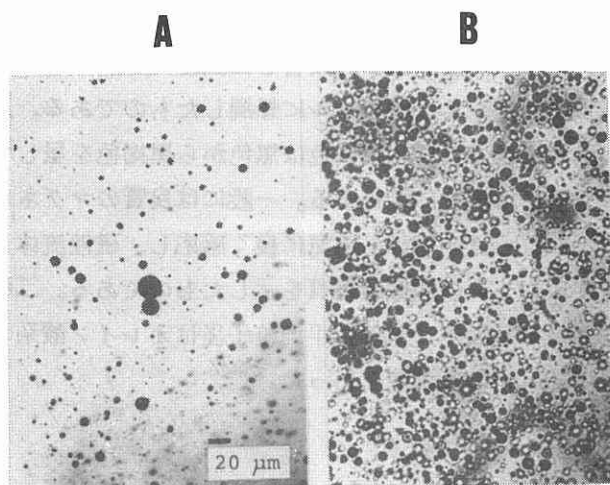


Fig. 13 Microphotographs of Magnetic Emulsions

- (A) Oleic Acid-based Magnetic Emulsions
- (B) Ethyl Oleate-based Magnetic Emulsions

第3章 磁性エマルションの安定性に関する検討

エマルションにおいて製剤化し易く、安定であることは製剤上非常に重要なことである。しかし、本来乳剤、懸濁剤のような分散系は物理的に不安定なものである。これら分散粒子には常に重力または浮力が働いているし、粒子が微細になれば微細になる程界面は大きくなって、その大きな界面エネルギーは凝集力として粒子間に働き、均一な分散を妨げると考えられるからである。そのため、第1章で述べたようなエマルションの安定性の評価方法は製剤学上重要な意義をもっている。しかし、磁性液を乳化することによって製した磁性エマルションはそのベースオイルを乳化したエマルションとはいくぶん性質を異にする。そこで、第1章で使用した評価法に若干の改良を加えて、磁性エマルションの安定性を評価し、オレイン酸ベースおよびオレイン酸エチルベースの二種類についての比較検討を行った³⁹。

第1節 沈降容積の測定

磁性液は通常の油脂や脂肪酸よりも比重が大きく、 o/w 型エマルションの場合、油滴は浮上せず沈降することが観察される。そのため、調製直後エマルション層の容積(V_0)に対する時間(t)における沈降容積(V_t)の比を縦軸に、横軸に時間をとって視覚的な面から安定性を評価した (Fig.14)。

$$F = V_0 / V_t \quad \cdots \cdots \cdots (\text{Eq. 1})$$

製剤で使用される分散粒子は $1 \mu\text{m}$ 以上のものが多く、この粒子領域では粒子が一つずつ独立の運動体として沈降する場合と、いくつか集まって集団となって沈降する場合とがある。前者は自由沈降、後者を凝集沈降といい、このいずれかの沈降をするかということは、製剤の品質上、重要な意味をもっている。

粒子が沈降して器底に達し互いに接触して合一を起こすような沈層は再分散が容易ではなくなるが、これは粒子間に凝集力の働かないときに起こりやすい。しかし、凝集力がある場合には、沈降粒子層の見掛けの容積は最密充填の場合よりも大きくなる。すなわち、カゼインのようなタンパク質や高分子物質、界面活性剤のような保護コロイド剤が粒子表面に存在したり、粒子の荷電によって静電的な反発力が働くとすると粒子の接触は妨げられた状態でゲルが存在し、比較的弱い力でゲル構造が破壊される。沈降層が

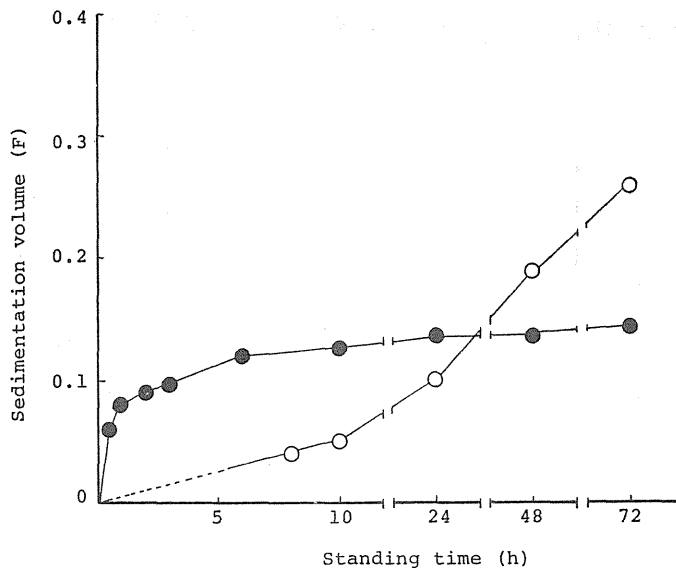


Fig. 14 Plot of Sedimentation Volume versus Standing Time for Magnetic Emulsions
(●) Oleic acid, (○) Ethyl oleate

このようなやわらかいゲルになるような場合、分散系は振盪によって容易に再均一化することができる。二種の磁性エマルションは時間とともに沈降容積が増加したが、オレイン酸系では調製直後からすみやかに水相と沈積層の二相に分離した。72時間後には見掛け上約70%の油相が沈降した。一方、オレイン酸エチル系ではこの分離はゆっくりで、水層、エマルション層および沈降層の三相に分離した。オレイン酸系は自由沈降型の沈降を示し、充填された沈積層を形成した。磁性液中のマグネタイトはこの沈層中で相互に凝集して油相との分離が生じ、再びエマルションとして分散することが難しいことが考えられる。

しかしながら、オレイン酸エチル系は凝集沈降であり、最終的な体積は大きくなり、攪拌によって再分散が可能であった。このような事実により、磁性エマルションの場合ではある程度の凝集力が関与した方が安定であることがわかった。

第2節 磁性エマルションの粒子数の測定

単位体積当りのエマルションの粒子数を知ることが安定性を知る上で有力な手段であることは第1章でも述べた。そこで、磁性エマルションの粒子数をコールターカウンターにより測定して安定性評価の指標とした。Fig.15は粒子数の経時変化を示している。

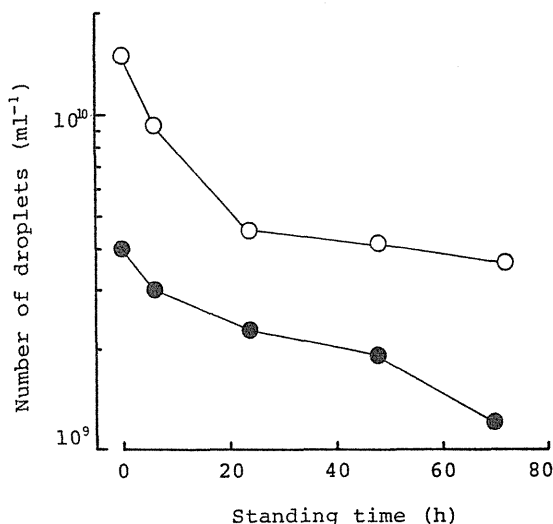


Fig. 15 Change of the Number of Droplets with Standing Time for Magnetic Emulsions Symbols; as in Fig. 14.

粒子数は沈降容積の増加につれて減少した。そして、粒子数は油相の種類によって影響を受け、オレイン酸エチル系の磁性エマルションの方がオレイン酸系のものよりも多数の油滴が観察された。このことから、安定性はオレイン酸エチル系の方が良好であることが判明した。また、経時変化については、オレイン酸系が24時間後に調製時の1/2の粒子数に、72時間後では1/4に減少しているのに対して、オレイン酸エチル系では72時間後にやはり粒子数は調製時

の約1/4に減少してはいるもののオレイン酸系と比較すれば、その約5倍が存在していることが確認された。オレイン酸系の油滴粒子数が調製時から少なく、以後も急激な減少を示したのは油相の沈積層中においてマグネタイトが凝集、分離して容器の底部に沈澱、固化してしまい、マグネタイトがベースオイル中に均一に懸濁して存在する油滴ではなく、油滴も容器底部で合一を起こしてしまっていると考えることができる。

第3節 密度の測定

一般に、エマルションの安定性はStokesの沈降理論より、分散油滴の粒子径と油相と水相間の密度の差に比例する場合が多い²⁵。そこで、水相および油相の密度を精密密度計を用いて測定した。

水相に用いた1%カゼイン水溶液(pH 8.0)の密度は0.999g/ml、一方、油相はオレイン酸ベースの磁性液が1.047g/ml、ベースオイルであるオレイン酸は0.885g/mlであるので磁性流体化することでかなり密度が増加することが認められた。オレイン酸エチルベースの磁性液は1.036g/mlであり、オレイン酸エチルの0.853g/mlよりもやはりかなり増加した。このため、油滴は沈降するが、連続相と分散相との密度の差は可能な限り等しい方が好しいとする観点から言えば、磁性エマルションのベースとしてはオレイ

ン酸エチルの方が優れていると考えられる。

なお、対照としては蒸留水とメタノールを用い、その密度は37℃における測定値0.993および 0.774g/mlをそれぞれ使用することによって試料の測定を行った。

第4節 粘度の影響

Fig.16および17は磁性液ならびに磁性エマルションの流動曲線を示したものである。図から明らかなように、磁性液はオレイン酸系もオレイン酸エチル系も非ニュートン流動を示した。

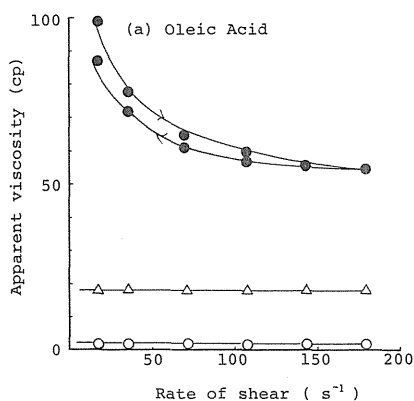


Fig. 16 Rheograms of Various Oily Vehicles:

(○) Magnetic Emulsion
(●) Magnetic Fluid
(△) Based-Oil

オレイン酸ベースの磁性液が76.5cpであったのに対してオレイン酸エチルベースの磁性液が 9.0cpであり、ずり速度が 36 S^{-1} の場合にはオレイン酸系の方が約8倍粘度が高かった。一方、それを乳化したエマルションは見掛け上ニュートン流動を呈した。同様に、対照として示したオレイン酸とオレイン酸エチルは単純なニュートン流動であった。

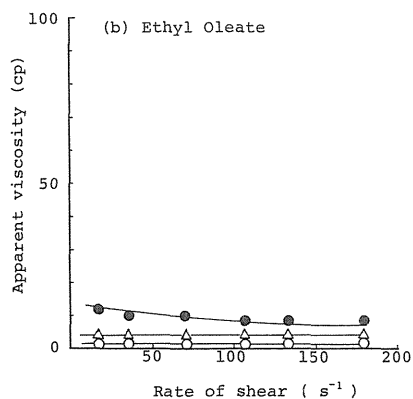


Fig. 17 Rheograms of Various Oily Vehicles

Symbols; as in Fig. 1

O/W 型エマルションは比較的低濃度の分散相で構成されているとき、それらはニュートン流動を示す場合が多い。すなわち、これらは分散相の容積比が 0.2以下という低い分散相濃度を有するエマルションに関しては低ずり速度の範囲内ではニュートン流動が得られるという理論に一致していると考えられる。⁴⁰⁾

二種類のエマルションを比

較するとき、用いた磁性液の粘度とエマルションの粘度とは無関係で、両者の粘度にはあまり差がない。磁性液はベースオイルの粘度に依存して粘度に差を生じたが、エマルションは両方とも低粘性を示している。一般的に言って、粘度が高くなればなる程、エマルションは安定になるとされる。²⁴ しかしながら、今回の実験においては磁性液の種類を変えて調製されたエマルションの安定性とその分散相である磁性液の粘度とはあまり関係がないように思われた。

第 5 節 考 察

磁性エマルションの安定性に及ぼす物理化学的因子をTable III にまとめた。安定性に影響を及ぼす要因のうちで粒子数、粒子径、密度、沈降容積 (F_{∞}) はオレイン酸エチル系の方がオレイン酸系よりもすぐれた数値を示した。

オレイン酸エチルベースの磁性エマルションは長時間の安定性が保持できた。この系は大きな沈降容積と濁った上澄みを有し、振盪によって容易に再分散できた。しかし、オレイン酸ベースの磁性エマルションは調製直後から沈降が急速に生じ、再分散の難しい沈積層を形成した。凝集系は最終的な沈降容積 (F_{∞}) が大きく、非凝集系では充填された沈積層を有して低い F_{∞} 値を示す。⁴¹ 一般に低い F_{∞} 値は再分散が難しいと考えられる。

Table III
Summary for Physical Properties of Magnetic Emulsions

Emulsion	A	B
Carrier liquid	Oleic acid	Ethyl oleate
Sedimentation volume F_{∞} (%)	14.2	26.3
Number of droplets ($\times 10^8$)	40	140
Density of magnetic fluids (g/cm ³)	1.047	1.036
Viscosity (cp)	1.70	1.44

磁性粒子の使用は臨床および生物学的研究においてかなりの興味をもたらしている。^{42, 43} 現在まででは、診断学の分野で体外から自由に誘導が可能なフェライト造影剤の開発実験が進められ、動物を使った消化器などの造影実験で造影能が良好であることが確かめられている。⁴⁴ また、磁性液のすぐれた流動性と磁場における保持能力は腫瘍組織の治療法の一つである血管エンボリゼーション治療に従来のマイクロカプセルや小球体以上の効果と選択性を提供するかも知れない。⁴⁵ 鉄粉を利用した治療法ではカルボニル鉄を頭蓋内動脈瘤に誘導し、破裂した血管部位に人工的な栓子を形成することで、本来縫合しなければならない病巣の修復治療に効果を上げた臨床例も見られる。同様に、磁性エマルションも種々の病態において大きな臨床応用の可能性を秘めている。そこで、次編においては、このエマルションの特性である磁気感应性について論述する。

第2編 磁性エマルジョンの磁気応答性

癌の化学療法においては目的とする腫瘍部位に高濃度でしかも正確に制癌剤を転送することが重要である。²² 薬物担体の使用は薬物の生体内分布を修飾する上で有用であり、また投与方法や投与部位を考慮することによって目的とした部位に担体を滞留させることが可能となる。例えば、スキャンニング剤として臨床に用いられているアルブミン小球体は有用な薬物担体であり、⁴⁷ 静脈内投与によって肝臓や肺に薬物を局在化することができる。⁴⁸⁻⁵⁰ また、リポソームやエマルジョンはそれぞれ精巣内あるいは筋肉内に投与するとき、リンパ内濃度が高まることが報告されている。^{51, 52} 一般に、担体を脈管内投与すると、その粒子径に依存して分布することが知られ、ゼラチンマイクロカプセルやアルブミン小球体の粒子径を変えることで肝臓ないしは肺に集中的に局在化させる試みもなされている。^{14, 53} しかしながら、こうした分布は生体側の機能に依存するところが大きく、薬物の臓器選択性という点から、他の各組織や臓器にも特異的であることが切に望まれてきている。

Widderらはアルブミン小球体に鉄フェライトを含有させた磁気に感應する磁性アルブミン小球体を調製し、磁石を適用した尾部セグメントに尾動脈から投与した小球体の37-65%を磁石部位に局在化させたことを報告した。¹² また、加藤らは鉄フェライトと制癌剤であるマイトマイシンCを含有した磁性マイクロカプセルを調製し、家兎膀胱内の局部に集中させることに成功した。⁵⁴ 更に、森本、杉林らは磁性流体を磁性アルブミン小球体の調製に利用し、標的モデル部位として選択した腎臓および肺に小球体を集中させ、体内分布の磁場による制御が有用であることを証明した。^{13, 14}

エマルジョン製剤はリンパ指向性、組織滞留性や制癌剤の直接効果の増強などに有効であると報告されているが、⁵² 静脈内投与による分布の修飾に関しては大きな変化が認められず、脈管内投与によるメリットはあまり期待できない。⁵⁵

そこで、先に述べた磁性エマルジョンを使用し、その有用性を明らかにするため、実験動物の標的部位へのエマルジョンの局在化を試み、含有制癌剤の体内分布を磁場によって制御することを検討した。

第1章 磁性エマルジョンの生体外磁気応答性の検討

磁石の適用によって標的臓器にどの程度磁性エマルジョンが局在できるかは含有薬物の標的部位における分布パターンの決定およびその後の薬理効果を期待する上で非常に重要な情報になると考えられる。そこで、生体内での磁気誘導実験に先だち、ガラス管を用いて作製したin vitro 血管モデルでの磁気誘導実験を行った。in vitro における磁気感应性の良さとすぐれた局在性は in vivo における局在化の指標になると考えられるため、エマルジョンの磁気誘導性を視覚的な面およびマグネタイトと油相の磁場における保持の面から詳細に検討した。^{21, 56}

第1節 磁性エマルジョンの磁気応答性

Fig.18およびFig.19はそれぞれオレイン酸ベースおよびオレイン酸エチルベースの磁性エマルジョンの一定量を乳濁させ、それをシャーレに移し、サマリウムコバルト製のディスク状永久磁石、約3000ガウス(G)を適用後、それぞれ0、10、30、60秒後における連続写真を示した。磁石適用前(0秒)、均一に乳濁していたエマルジョンは磁石適用によって生じた力により、すみやかに磁石周辺部に集まっていくのが観察された。磁性エマルジョンはその上清も黒褐色を呈しているために写真からだけでは判断しにくい、大部分のエマルジョンは60秒後には磁石周辺に集まり、その後のエマルジョンの移動はほとんど見い出せなかった。このように、磁性エマルジョンは磁気に良く感应し、磁力によって誘導されるという優れた磁性応答性を示すことが認められた。

また、視覚的にはオレイン酸エチル系の方がシャーレ内の濁度が磁石適用により大きく減少し、このことからオレイン酸系よりもオレイン酸エチル系の方が磁気応答性の良いことが推測された。

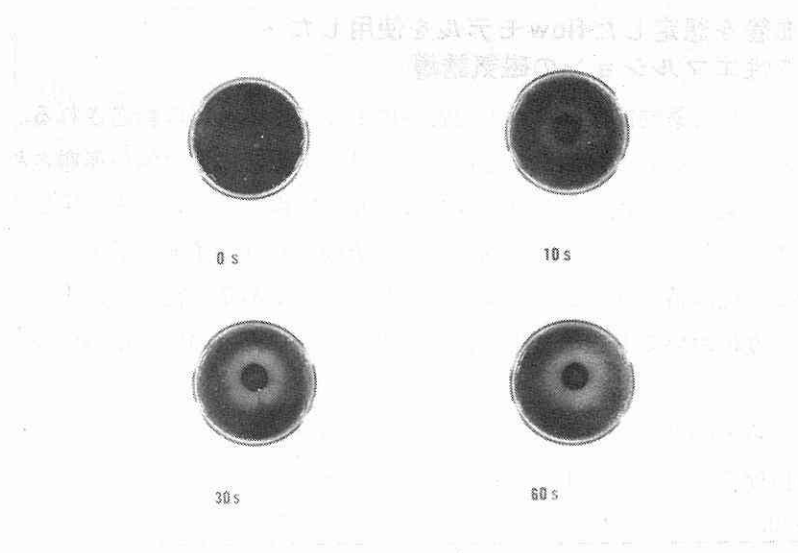


Fig. 18 Time Sequence Photographs of Oleic Acid-Based Magnetic Emulsions after Application of a Disc Magnet

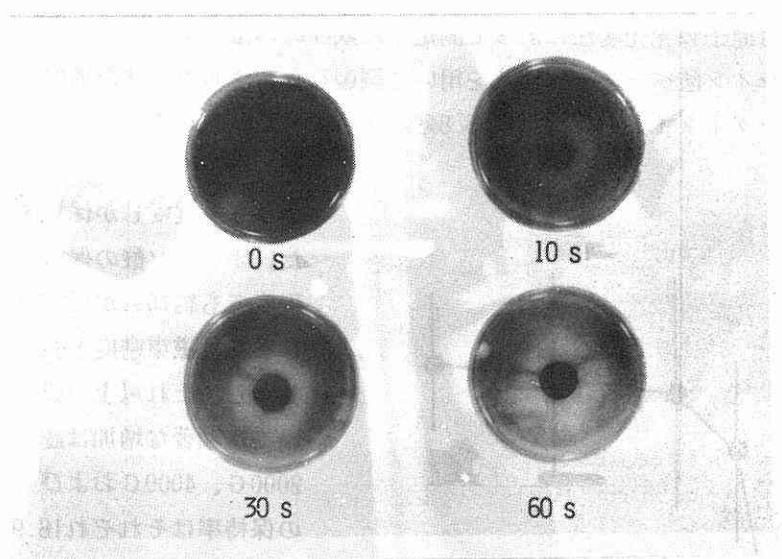


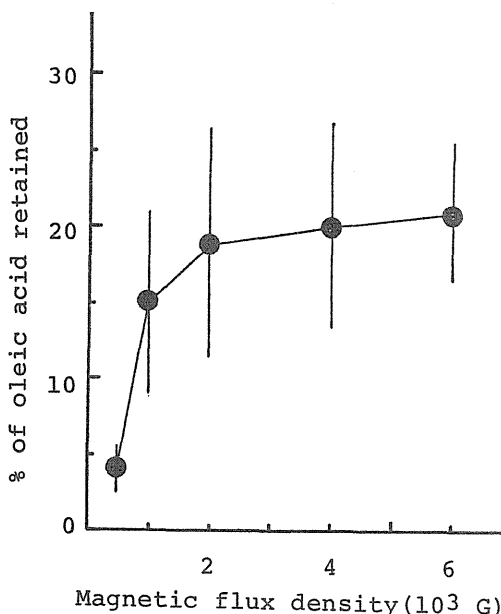
Fig. 19 Time Sequence Photographs of Ethyl Oleate-Based Magnetic Emulsions after Application of a Disc Magnet

第2節 血管を想定したflowモデルを使用した 磁性エマルシヨンの磁気誘導

生体内に投与された薬物担体は種々の血管系によって生体各部に転送される。しかしながら、血流によって標的以外の正常組織あるいは正常臓器にも担体が運搬されて標的部位への集中的な薬物の局在化という目的が果たせない場合も多い。また磁気感受性を有する薬物担体が開発できても、脈管内投与し、流動するコロイド粒子を外部磁場によって血管床内に捕捉滞留させることは非常に難しい問題である。従って、生理的条件下における血流速度においても磁場発生部位に集中が可能なだけの磁気応答性が必要であるといえる。

そこで、これらの問題を検討するために磁性エマルシヨンをガラス管内で流動させ外部磁場による捕捉を目的とした実験を行なった。ヒトの大動脈および細小動脈までの血流速度は30~40cm/secから0.2~1.0 mm/secと様々である。また、血管径も肺動脈の3cmから8~20 μ の毛細血管に至るまで種々変化している。そこで、中等大程度の動脈のモデルとして、内径6mmのガラス管を用い、等張リン酸緩衝液(pH7.4)を流動速度15cm/sec(流量100 ml/min)で流動させた。そしてガラス管外部から発生させた磁場に捕捉されたエマルシヨンを油相およびマグネタイトの量から求め、脈管内での保持の程度を調べた。定量は油量がトレーサーとして添加された 14 C-パルミチン酸の放射活性を、マグネタイトは原子吸光光度法によって測定した鉄(Fe)の量を指標にして行った。

Fig.20はオレイン酸ベースの磁性液を用いて調製したエマルシヨンの捕捉率を示したものである。マグネタイトの保持率は33.8%が保持された。しかし、逆に低磁場側では



保持率が低く、500-1000 Gでは2-3%程度しか保持できなかった。オレイン酸の保持率は1000 G程度でも約15%が保持され、2000 Gまでは磁束密度と共に増加した。しかし、それ以上の磁場強度においては顕著な増加は認められず、2000 G、4000 Gおよび6000 Gでの保持率はそれぞれ18.9%、19.9%および21.2%とほとんど変化が認められず、同じ磁力におけるマグネタイトの保持率と比較すると低い値であることが観察された。

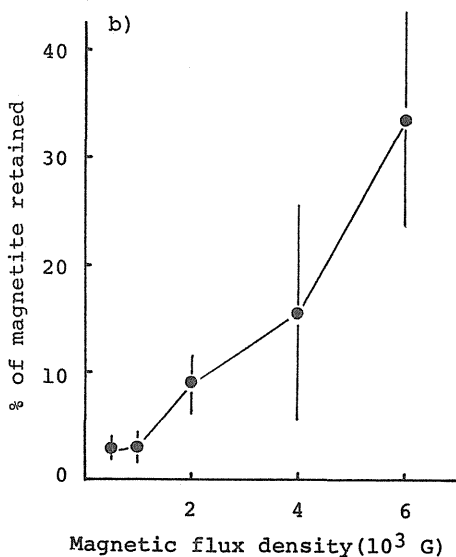


Fig. 20

Retention of Oleic Acid-Based Magnetic Emulsion Flowing in pH 7.4 Isotonic Buffer as a Function of Magnetic Flux Density

(a) Oleic Acid

(b) Magnetite

この現象はマグネタイトと油相の分離が生じ、分散媒であるオレイン酸だけがガラス管内に発生している緩衝液の流動によって標的部位から排除されたことを示すものである。このように、安定性の低いオレイン酸系の磁性エマルジョンは磁力を負荷することによって不安定となり、薬物のcarrierである油滴の保持が難しくなることが認められた。

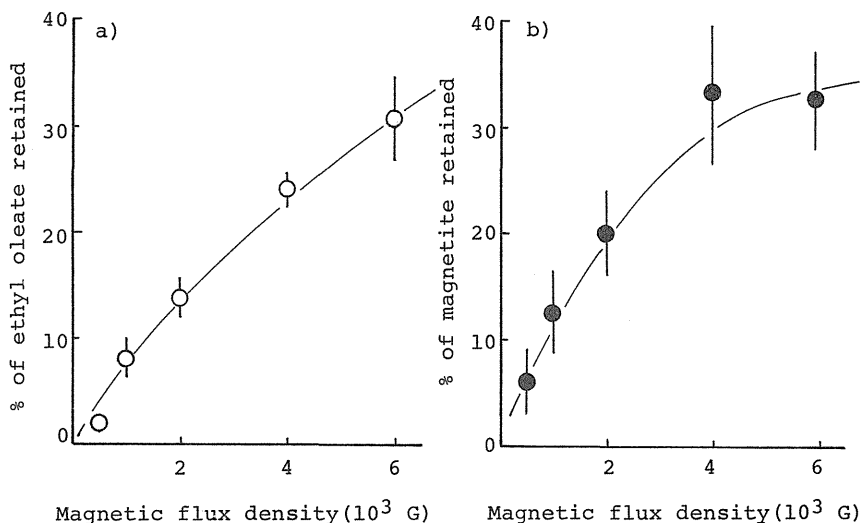


Fig. 21 Retention of Ethyl Oleate-Based Magnetic Emulsion Flowing in pH 7.4 Isotonic Buffer as a Function of Magnetic Flux Density

(a) Ethyl Oleate

(b) Magnetites

Fig.21はオレイン酸エチルで調製された磁性エマルジョンの捕捉率である。マグネタイトの保持は1000 G 以上で顕著に増加し、6000 G では30.8%が保持された。また、オレイン酸エチルは6000 G で33.0%が保持された。マグネタイトもオレイン酸エチルもその捕捉率は磁束密度の増加に伴って増加し、油滴からのマグネタイトの分離が少ないため、両方の保持率の測定値はほぼ一致していた。以上の実験より、オレイン酸およびオレイン酸エチルベースの磁性液を用いて調製した磁性エマルジョンが溶液の流動するガラス管内においても磁力によって保持されることが認められた。この保持量は磁性液の安定性、流速、磁力さらには磁石のポール面積と密接に関係すると思われる。本実験においては、ポール面積を変化させなかったため、4000 G 以上になるとポール面積に相当するガラス管の内側の部分に、エマルジョンが密に保持され一定の厚さを有する様になっていた。このことが、Fig.21(b) に認められた保持量の飽和と関係しているのかも知れない。この現象の解明はエマルジョン油滴が磁石の設置部位で乱流になるであろうと推測されることから、流れの機構をも検討する必要がある、今後の課題と考えている。しかしながら、オレイン酸エチルベースの磁性エマルジョンの方が磁場をかけたときの安定性においても、緩衝液の流動に対する安定性に関しても優れていることが確認され、さらに脂溶性の薬物の封入に必要な油滴はオレイン酸エチルの方が高い保持率を示し、4000 G 程度の磁力でも注入量の約3分の1程度の保持が認められたことより、薬物担体としての磁性エマルジョンの脈管内における磁気誘導が可能であることが判明した。

第2章 磁性エマルジョンによる臓器選択性の増強

腫瘍部位に対して化学療法剤を集中的にかつ長時間局在化させ、他の組織に何らの障害も与えないことが副作用、組織到達性および持続性に欠陥がある制癌剤の治療効果を向上させる上で理想であるとされている²²。そこで、著者は磁気による誘導が可能で、しかも生理的条件下ならびに磁場にさらされた状態においても安定な磁性エマルジョンを制癌剤の薬物担体として使用することを試みた⁵⁶。生体の病巣部位に外部から磁場を適用すれば、エマルジョンの油滴に含有された制癌剤も標的部位に集中し、他の正常組織と薬物との相互作用を緩和するばかりでなく、集中的な化学療法を行うことができると考えられる。そこで、既に安定性と磁気応答性について検討した二種類の磁性エマルジョンについて、*in vitro* における磁気誘導に関する検討を行った。本章は標的臓器としてラットの肺を選択し、ラットの胸部および背部に電磁石を設置後の磁性エマルジョンの生体内分布および標的部位における選択的局在化についての検討結果を詳述する。

第1節 オレイン酸エマルジョンの生体内分布

Fig.22はマグネタイトを含まないオレイン酸で調製したエマルジョンの臓器分布を示したものである。平均粒子径が約 $4\ \mu\text{m}$ のオレイン酸エマルジョンは主に細網内皮系の発達した肝臓に多く分布し、肺での取り込み率は約3%程度であった。静注用乳剤の分布はその分散相を構成している油脂や脂肪酸の種類を変えたところで特異的な局在性が生じるということはなく、粒子径の違いに分布が依存する程度で、何らかの方法で分布を大きく修飾した報告はほとんど見られない。^{55,57} そこで、著者は磁性エマルジョンの使用により静注用乳剤の分布を修飾することを目的として実験を行った。⁵⁸

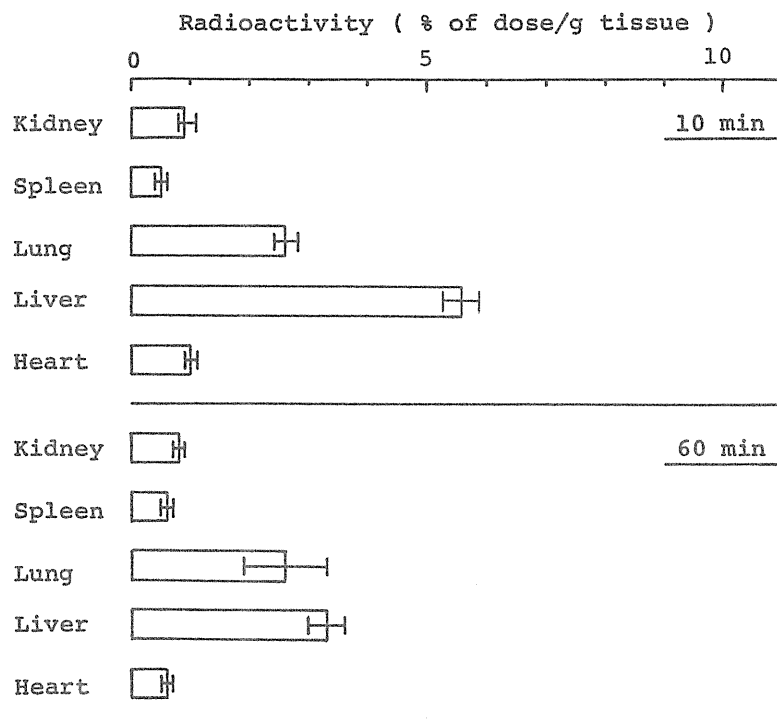


Fig. 22 Tissue Distribution of Radioactivity 10 min and 60 min after Injection of o/w Type Oleic Acid Emulsion Containing ^{14}C -Palmitic Acid through the Tail Vein

第2節 オレイン酸ベースの磁性エマルシヨンの生体内分布

肺にエマルシヨンを集中するためラットをペントバルビタール腹腔内投与によって麻酔した後、胸部と背部に電磁石を設置し、 ^{14}C -パルミチン酸は油滴の挙動を示すと同時に、エマルシヨンに含有できる脂溶性薬物モデルとして、その分布挙動を調べる上で好都合なトレーサーである。従って、磁石の適用によって標的臓器（肺）に集中したエマルシヨン自体の分布ならびに脂溶性薬物量を ^{14}C -放射活性によって検討した。

Fig. 23は投与後10分における ^{14}C -放射活性の臓器分布である。オレイン酸系の磁性エマルシヨンの場合、安定性およびin vitro 磁気感応性実験の項で述べたように不安定であり、合一性が大きかった。そのため、尾静脈内投与したラットに肺栓塞の副作用が大きく出現し、実験に支障をきたしたので、あらかじめエマルシヨンを生理食塩水で2倍に希釈して投与した。臓器分布は磁石を適用しなかったコントロール群、磁束密度をそれぞれ2000、4000および6000 Gにして適用したときの合計四群についての実験結果である。コントロール群の肺への分布量は 3.0%/g tissue であったが、磁石の適用によって2000 G、4000 Gおよび6000 Gでそれぞれ 8.7、11.9および11.4%/g tissue まで増加し、磁力によって標的部位に磁性エマルシヨンを局在化させることが可能であること

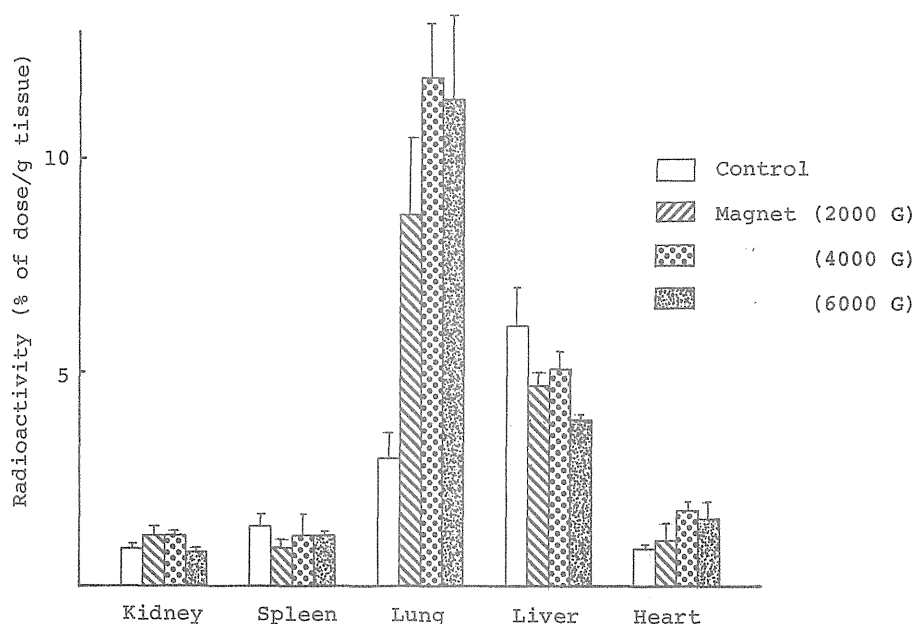


Fig. 23 Tissue Distribution of Radioactivity 10 min after Injection of Oleic Acid-Based Magnetic Emulsion Containing ^{14}C -Palmitic Acid through the Tail Vein

が判明した。

磁石の適用によって標的臓器に局在したエマルジョンがさらに長時間磁力を適用した場合にはその部位にどの程度保持されているか、また含有された脂溶性薬物はどのような消失挙動を示すかについても検討を加えた。

Fig. 24は60分間磁石適用時の分布パターンであるが、肺への取り込み量は 3.6%/g tissueで10分間適用時と大差がなかった。しかし、磁石適用群では10分時よりも約4%の減少が観察された。この50分間に肺から消失した放射活性は60分時の肝臓の分布量が10分時よりもそれぞれ1%程度増加したことから、大部分が肝臓にその他若干が脂肪組織や脾臓に取り込まれたものと思われる。このように磁性エマルジョンはin vivoにおいても磁力による誘導が可能で、ある程度の局在化と保持が可能であることが実証された。しかし、局在した絶対量は少なく、選択性や治療効果を考える上では十分とはいえない。そのうえ、投与時において肺栓塞などの副作用の心配がない安定なエマルジョンで、希釈の必要のない注入可能な製剤が望ましい。この面からも、オレイン酸系の磁性エマルジョンは満足できる剤形とは決して言うことができない。

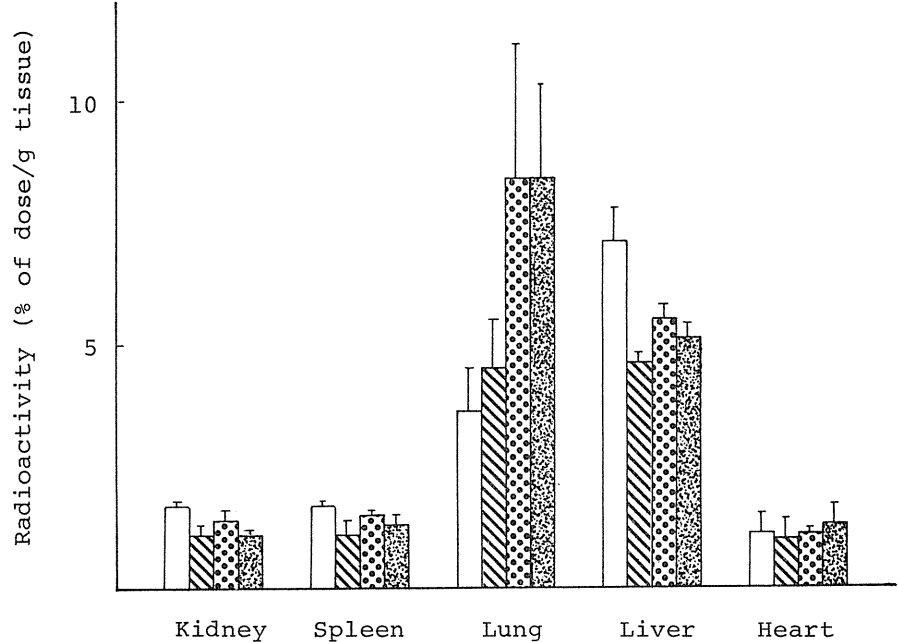


Fig. 24 Tissue Distribution of Radioactivity 60 min after Injection of Oleic Acid-Based Magnetic Emulsion Containing ¹⁴C-Palmitic Acid through the Tail Vein Column; as in Fig. 23.

これらのことから、in vitro の安定性試験において好成績を示したオレイン酸エチル系の磁性エマルジョンを使用して実験を行ない、オレイン酸系の磁性エマルジョンの欠点の改善が可能かどうかを検討した。

第3節 オレイン酸エチルベースの磁性エマルジョンの生体内分布

本節ではオレイン酸エチル系の磁性エマルジョンの生体内分布について検討した。

Fig. 25は尾静脈内投与後10分間磁石適用時の臓器分布を示した。投与後10分の肺中のエマルジョン量はコントロールで16.8%/g tissueであったが、磁石適用群では2000、4000および6000 Gでそれぞれ28.9、32.5および32.7%/g tissue とコントロールの値の約2倍に増加した。磁石適用群中には投与量の50%以上を標的臓器中に保持した動物も数例認められ、オレイン酸エチル系の磁性エマルジョンを効率良く保持できることが示唆された。

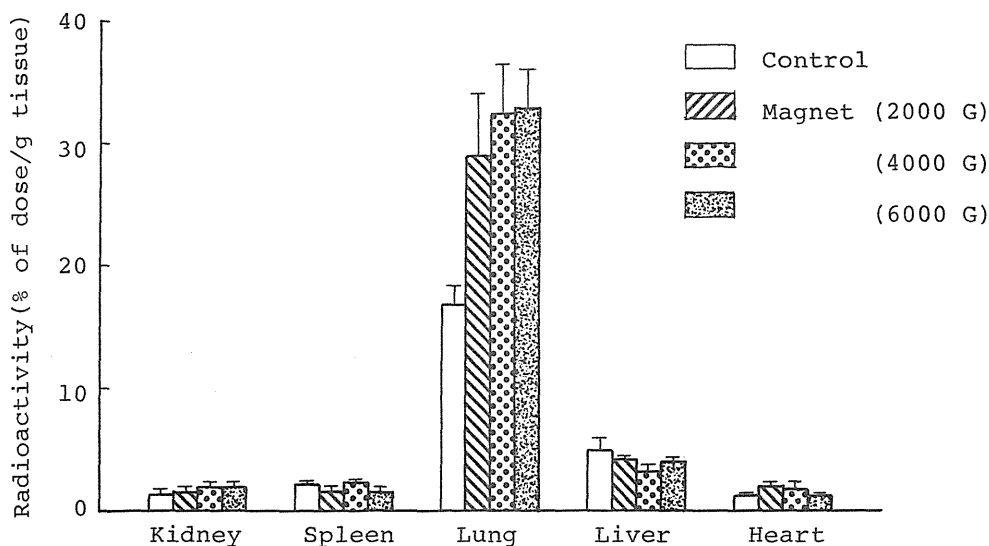


Fig 25 Tissue Distribution of Radioactivity 10 min after Injection of Ethyl Oleate-Based Magnetic Emulsion Containing ^{14}C -Palmitic Acid through the Tail Vein

Fig.26は60分間磁石適用時の生体内分布である。コントロールでは標的部位の放射活性が $8.1\%/g$ tissue に減少している。また、磁石適用群でも放射活性が10-11%程度減少し、磁石の適用時間と共に保持率がある極大値になるのではなく、静注後の肺の first-passによってほぼ極大保持が達成され、その後はゆっくりと肺から washout されると推測される。すなわち、この系においても10分間から60分間の間に C-パルミチン酸は肺を離れ、肝臓や他の組織に血流を介して取り込まれたと考えられる。事実、肝臓における濃度が $1.0\%/g$ tissue 程度（投与量の約10%程度）増加しているのが認められた。また、血中における放射活性も投与後10分で $0.2\%/ml$ bloodから60分後では $0.5\%/ml$ bloodに増加しているのが観察された。

しかしながら、オレイン酸の磁性エマルジョンと比較すれば、脈管内投与による肺栓塞の危険性は少なく、希釈せずに使用することができた。そのため、はるかに多量エマルジョンの投与と保持が可能となるであろう。この有効性および安全性の増加はオレイン酸エチルベースの磁性液が低粘性であることと安全性の良いことに起因するためと考えられる。これらの結果より、オレイン酸エチル磁性エマルジョンは磁気誘導によって標的部位に薬物を運搬できる優れた Site Specificity を有する薬物担体であることが認められた。

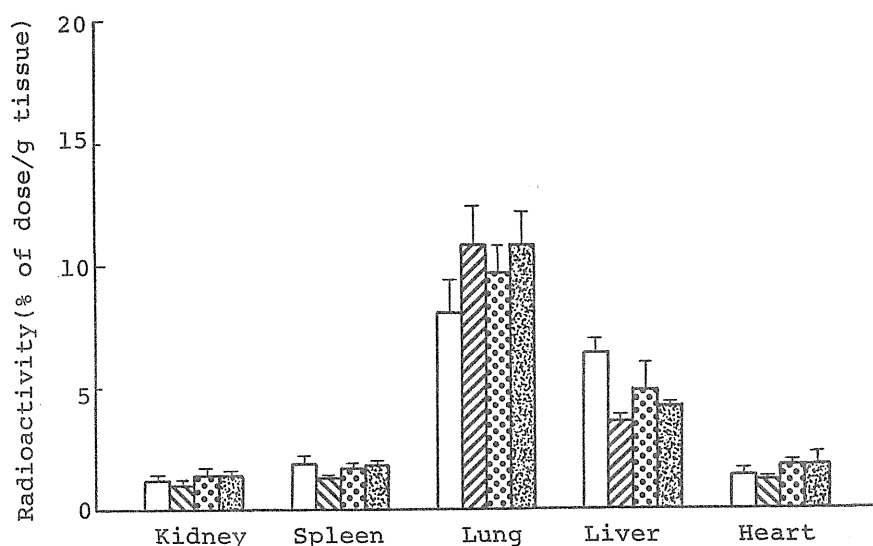


Fig. 26 Tissue Distribution of Radioactivity 60 min after Injection of Ethyl Oleate-Based Magnetic Emulsion Containing ^{14}C -Palmitic Acid through the Tail Vein Column; as in Fig 25.

第4節 マグネタイトの分布に関する組織学的検討

以上、油相中に含有された ^{14}C -パルミチン酸の放射活性の分布について調べてきた。次に、オレイン酸エチルベースの磁性液中に含まれるマグネタイトの分布についても検討を加えた。

Fig.27は磁性エマルジョン尾静脈投与後の肺の組織切片写真である。(a)は未処理のコントロール、(b)は磁石を適用しなかったもの、(c)は6000 Gで10分間磁石を適用した肺を示した。鉄の染色には三価の鉄イオンの染色法であるベルリン青法を、核染色にはサフランイン液を用いて行なった。

エマルジョン中に含まれるマグネタイトが肺に到達したとき、肺毛細血管床に滞留していることや気管近傍に保持されていることが、これら顕微鏡写真から観察できた。磁石を適用した切片の方が適用しなかったものと比較して多少マグネタイトの量が多いように見られるが、視覚的な検討からなので断定はできない。

肺のフィルター効果を受けずに通過したエマルジョンは主として肝臓に集積する。Fig. 28は肝臓の組織切片であるが、マグネタイトが洞様毛細管を経て、肝実質細胞の間に出現しているのが認められ、それらは比較的中心静脈の近傍に多く見ることができた。肝臓の場合も肺における磁石の有無による差は顕著ではなかった。

第5節 考 察

近年、担体中に薬物を封入し、診断あるいは治療の目的で使用する試みが増加してきている⁵⁸。しかしながら、有用な臨床応用を可能にするためには、担体の自由な誘導、制御がなされ、種々の病巣に広く適用できるようにすることが必要である。⁴²

医療上、種々のタイプのエマルジョンが投与剤形として使用されている。Elson らは多相エマルジョン(w/o/w型)に封入したメトトレキサートがその水溶性の活性型薬物として徐々に放出されることで薬理学的効果の延長が認められたことを報告している⁵⁹。さらに、橋田らはエマルジョン製剤の使用がリンパ管への制癌剤の標的化および転移の防止に非常に有効であることを提示した¹⁷。また、Litterest らは脂溶性制癌剤である CCNU を臨床的に用いられている三種類のエマルジョン処方では静脈内投与して生体内分布を観察した⁵⁵。この試みは主として経口投与で用いられる CCNU の応用範囲を拡大したものと言えるが、三種のエマルジョン処方において顕著な分布の差は観察できず、病巣部位に応じて使い分けられるようなことはできなかった。

本章において、既に述べたようにオレイン酸エチルベースの磁性液を用いて調製した磁性

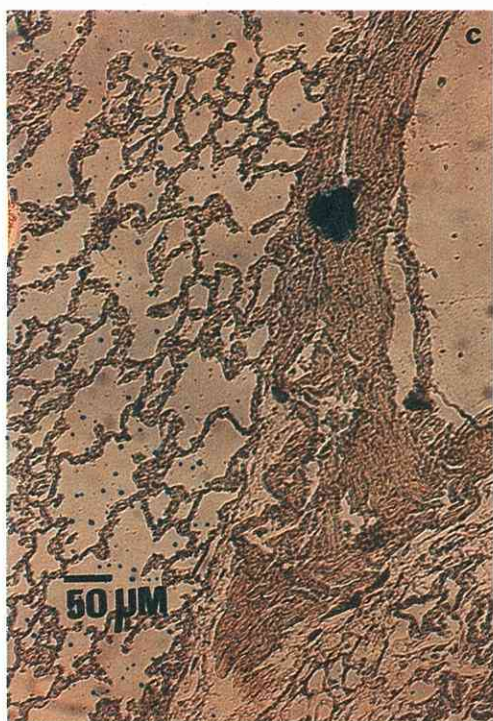


Fig. 27

Photomicrographs of the Lung
(Fe stain) at 10 min after
Intravenous Injection of
Magnetic Emulsions

- (a) Control
- (b) Non-Magnet
- (c) Magnet

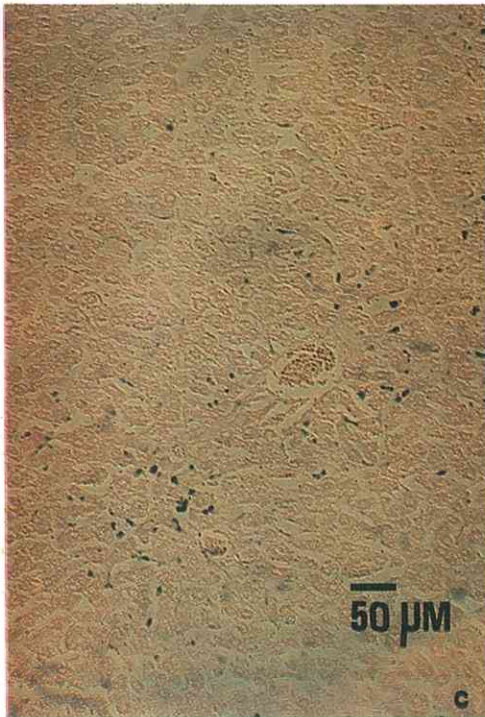
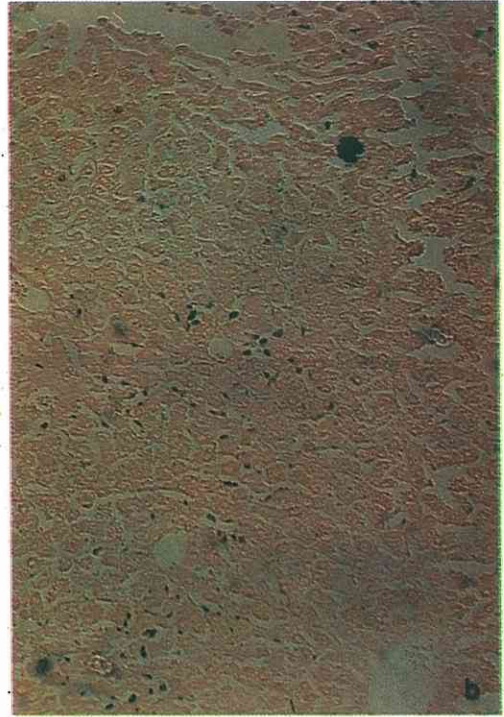


Fig. 28

Photomicrographs of the Liver
(Fe stain) at 10 min after
Intravenous Injection of
Magnetic Emulsions

- (a) Control
- (b) Non-Magnet
- (c) Magnet

エマルションは磁気による標的性の制御が可能であり、多量のエマルションを局在化させることができた。磁力によるエマルションの標的化は生体の機能に依存するのではなく、エマルション自体の磁気特性と適用される磁力の強さに依存している (Fig. 21、24)。

それ故、脂溶性薬物の担体として強力な磁気感应性と優れた安定性をもった磁性エマルションの使用は癌の化学療法のための優れたデリバリーシステムになり得る可能性を有する。

オレイン酸エチル系の磁性エマルションは安定性、磁気応答性および静脈内投与時における安全性に関してオレイン酸系の磁性エマルションよりも優れていた。静注後10分で、16.2%/g tissue のエマルションが磁石を適用しなかった肺に集中した (Fig. 24)。磁性エマルションの分布は肺の毛細血管床に取り込まれる現象や肺を通過した後の肝臓における食作用によって説明できると思われる (Fig. 26、27)。分布パターンはエマルションの粒子径にも依存すると考えられ、粒度分布が若干広い磁性エマルションの肺への蓄積は粒子が微細で粒度分布の狭い脂肪乳剤と比較すれば多いものになると考えられる。^{55, 57} しかしながら、磁石適用群における標的部位でのエマルション量は磁力で保持されて、いずれもコントロールの約2倍に増加した。これらのことより、エマルションの分布は粒子径に依存するだけでなく、その磁気特性によっても分布が修飾できることを示している。すなわち、磁性エマルションは磁力による相対的な体内分布の修飾が可能であり、封入される脂溶性薬剤はエマルションの局在化に従って転送されるので、磁性エマルションは有用な担体の役割を果たすことができるものと考えられる。^{55, 57}

しかしながら、60分間磁石を適用したときでは磁石適用群とコントロール群との間に顕著な分布の差は認められなかった (Fig. 26)。投与後10分間適用と60分間適用との間での取り込みの差は肺内での血流の washout 効果によると考えられ、最初に取り込まれたエマルションが次第に血流によって肺から流出したものかも知れない。¹⁴ また、磁性液は水と接触することにより数日間うちにコロイド懸濁液の分解をひき起こすと云われている。⁶⁰ そのうえ、肺に対する強力な磁力の適用はこの現象を促進し、磁性液からのマグネタイトとベースオイルの分離を生じるので、washout 効果はよりいっそう進行することが考えられる。⁵⁶ Fig. 26 の結果は標的部位におけるエマルション保持に電磁石の適用時間が大きな意味をもっていることを示唆している。しかし、エマルションの保持に対する磁石適用時間の影響は実際、複雑な問題であり、今後さらに実験と検討が必要であると思われる。^{14, 56}

脂溶性薬物のドラッグデリバリーシステムとしての磁性エマルションの応用は薬物担体の局在する部位に薬物が集中することによって腫瘍の治療に大きな利点をもつように思われる。さらに、血中および非標的臓器中の制癌剤の濃度を減少することは副作用の軽減の意味からも望ましいことであるので、あらかじめ限定した標的部位に薬剤を運搬できる特異的なキャリアーシステムを使用することは非常に有用である。今後の研究ではこのことを確認することが必要であり、本剤形を用いた制癌剤の治療効率の検討を行ったので、次

編では磁性エマルシヨンの投与剤形としての有用性について論述する。

第3編 磁性エマルジョンの投与剤形としての基礎的検討

第1編および第2編で既に述べてきたように、オレイン酸エチル系の磁性エマルジョンは安定性にすぐれ、脈管内投与によって高濃度のエマルジョンを標的部位に局在できることが示された。^{20 56}

そこで著者は磁性エマルジョンを動物の病巣部位に作製した磁場によって局在化させ、腫瘍部位での選択的かつ集中的な化学療法に利用することを試みた。⁶¹ Fig.29 はこの考え方を模式図に示したもので、図から明らかなように腫瘍病巣部に磁場を発生させた後、磁気応答性を有する制癌剤含有磁性エマルジョンを脈管内に投与すると、標的部位にエマルジョンが高濃度に局在して、その部位での活性薬物の放出や病巣への直接効果などにより効果的な化学療法を行なうことができると想定される。⁶²

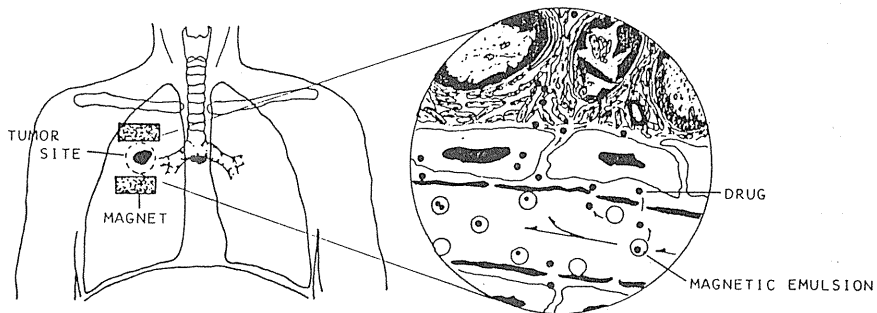


Fig. 29 Schematic Representation of the Possible Mechanism for Drug Delivery to Target Tissue by Magnetic Emulsion after Intravenous Administration

widderらはラット尾部に吉田肉腫を移植し、腫瘍部位に磁石を適用後、ドキソルビシンを含んだ磁性アルブミン小球体を動脈内投与したところ、磁石適用群では著しい腫瘍抑制が認められ、コントロール群に比較して広範な転移の抑制が得られたと報告している。⁶³ 加藤らは強磁性MMCマイクロカプセル (Ferromagnetic mitomycin C microcapsule) を調製し、家兎V₂膀胱腫瘍移植部の膀胱壁に磁石を適用して膀胱内にマイクロカプセルを注入したところ、高度かつ持続的腫瘍抑制が認められたと報告している。⁶⁴ また、森本らは磁性流体を利用して作製した磁性アルブミン小球体をAH7974転移肺癌ラットに投与し、含有したアドリマイシンの効果を遊離薬剤のそれと比較した。その結果、組織学

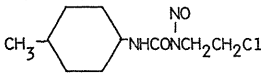
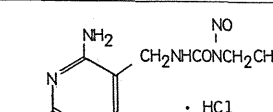
的に顕著な腫瘍抑制が小球体含有アドリアマイシンに見られ、その延命効果も遊離薬剤に比較して大きいことが認められた⁶⁵。著者も磁性エマルジョンの含有性を実用的な系で明確にするため、AH7974転移肺癌ラットを用いてエマルジョンに含有したニトロソウレア系制癌剤である 1-(4-amino-2-methyl-5-primidinyl)-methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosoourea, ACNU および 1-(2-chloroethyl)-3-(4-methylcyclohexyl)-1-nitrosoourea, Me-CCNU の抗腫瘍活性を測定して薬物担体としての有用性についても研究を行なった。

第1章 磁性エマルジョンからの薬物放出と ニトロソウレア系制癌剤の保護、安定化 におけるエマルジョンの有用性

磁性エマルションは脂溶性薬物の薬物担体として脈管内投与ができ、かつ強制的な分布の修飾が可能であることが明確になった。そこで、磁性エマルションのとしての機能を更に詳細に検討するためにモデル薬物として脂溶性ニトロソウレア系制癌剤 ACNU および Me-CCNU を用いて、不安定な脂溶性ニトロソウレアの保護、安定化ならびに持効化の向上に対するエマルション製剤の有用性の観点から実験を行なった。Table IV に二種の薬物の構造ならびに溶解度を示す。

ニトロソウレアの制癌作用はアルキル化とカルバモイル化であり、これは薬剤が未変化体のままで行なわれるのではなく、自然分解や生体内代謝によって複雑な構造変化によってなされる。生理的pHではこの分解は速やかに進行して細胞毒性を発揮する。

Table IV Structure and Solubility of Methyl-CCNU and ACNU

	water	acetone	benzene	chloroform	
 <p>(M.W. 247.7)</p>	0.05 (pH 6.8)	50	50	667	
 <p>(M.W. 309.2)</p>	0.75 (pH 6.8) 44.6 (pH 3.3)	0.14	0.005	0.053	

(mg/ml, room temperature)

また、親化合物は脂溶性が高いため投与経路にも制限があり、BCNUを始めとして CCNU ならびに Me-CCNU は主として経口投与が行なわれている。これらの事実は病巣部位に選択的かつ高濃度に集中し、しかも作用を制御しながら投与するには非常に難しい薬

剤であることを意味している。そのため、エマルジョン製剤として脂溶性ニトロソウレアを脈管内投与し、病巣部位のみに集中させてから、その部位でのエマルジョンからの薬物放出や製剤の直接効果などにより薬理効果を期待し、しかも作用を病巣にのみ局限して全身への副作用を軽減しようとする試みは理想的なものと言える。

本章ではニトロソウレアの各種水溶液中での安定性およびエマルジョン油相を構成するオレイン酸エチル中での安定性を測定してエマルジョン製剤とした場合の薬物の安定性を推定した。次に磁性エマルジョンからの水溶液中への未変化薬物の放出も測定して、投与剤形としての有用性を明らかにする。

第1節 エマルジョンによるニトロソウレア系 制癌剤の安定化

BCNUなどの脂溶性ニトロソウレア剤は水溶液中での安定性が悪く、満足な非経口投与剤形がないため、その強力な抗腫瘍活性を十分に発揮していないのが現状である。⁶⁹ 近年、CCNUおよびMe-CCNUのエマルジョン製剤が研究されているが、油脂中や生体液中での安定性についてはあまり知られていない。^{55 70}

そこで、Me-CCNUの安定性を水溶液中、生体液中さらに磁性エマルジョンの分散相であるオレイン酸エチル中に分けて評価した。また、脂溶性であると同時にその塩酸塩が水溶性であるニトロソウレア剤、ACNUの安定性についても同様に検討した。

Fig.30ならびにFig.31は水溶液中でのMe-CCNUの安定性に対するpHと温度の影響を調べたものである。図からも明らかなように、Me-CCNUは生理的条件下では不安定であり、高温ではこの分解反応がさらに進行するのが観察された。しかし、pH5以下の場合では比較的分解が遅いことが認められた。

Fig.32およびFig.33はACNUにおける同様の実験結果を示している。ACNUもMe-CCNUと同様に低pH側の方が比較的安定であり、pH5以下はMe-CCNUよりも安定であった。だが、pH7以上においては、逆にMe-CCNUよりもはるかに分解し易いことが確認された。

ニトロソウレアが生理的条件下で不安定であることから、生体液中でも安定性が悪いことが考えられる。そこで、家兎血清中での分解も調べた。Fig.34にその結果を示す。この場合、Me-CCNUの方がACNUよりも若干安定であったが、血清中での両薬剤の分解はすみやかであった。この結果は分解によって生じるisocyanateや2-chloroethyl carboniumが血液によって正常組織に運ばれたときでも細胞毒性を発揮する可能性を示唆している。

そのことから、磁性エマルジョンにニトロソウレアを封入して濃度依存性の本薬剤を局所に大量に保持する方法が有効ではないかと考えられる。Table V はオレイン酸エチ

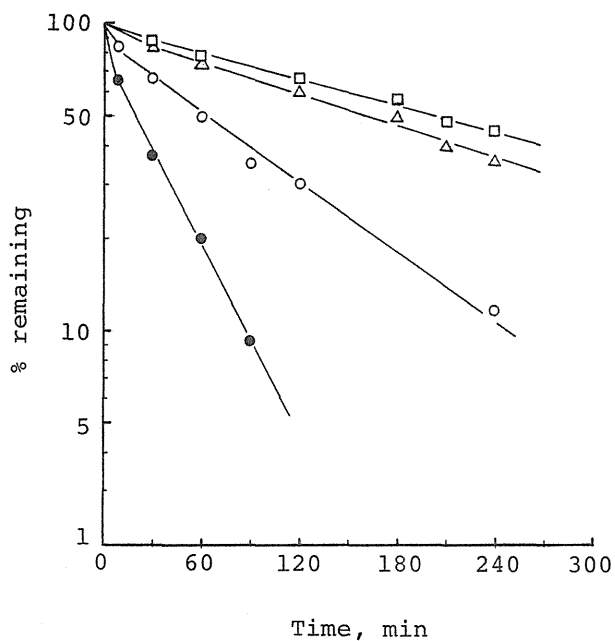


Fig. 30 Decomposition of Me-CCNU in Aqueous Solution at 37° C
 (Δ) pH 4, (□) pH 6, (○) pH 7, (●) pH 8.

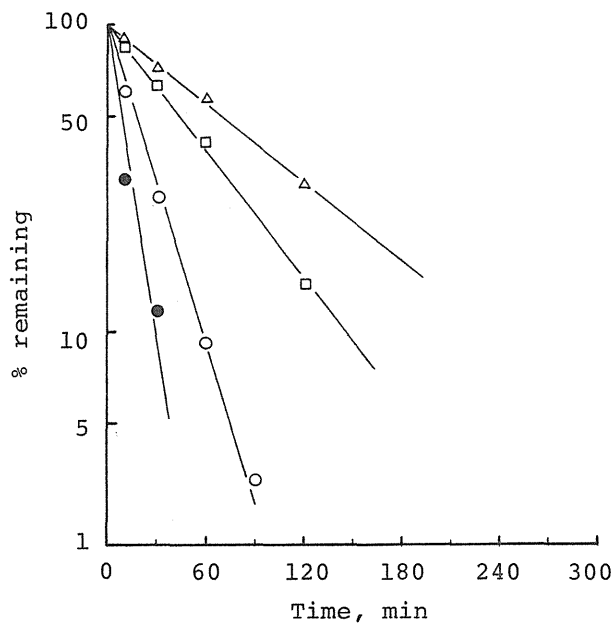


Fig. 31 Decomposition of Me-CCNU in Aqueous Solution at 50° C
 Symbols; as in Fig. 30.

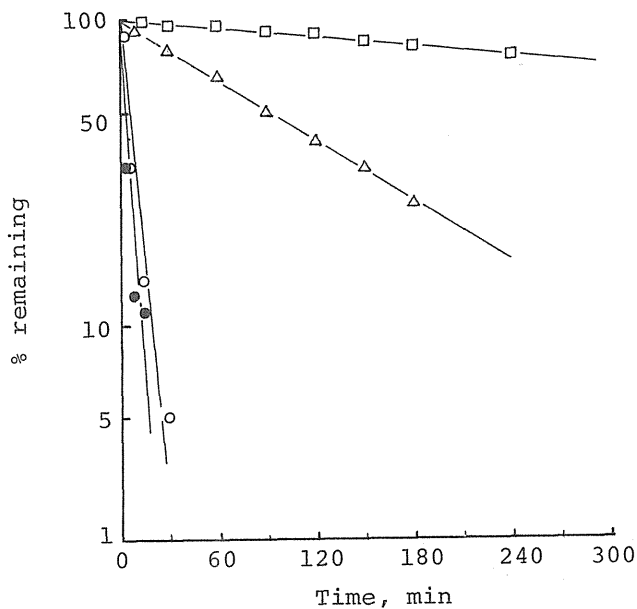


Fig. 32 Decomposition of ACNU in Aqueous Solution at 37° C
 (□) pH 4, (Δ) pH 6, (○) pH 7, (●) pH 8.

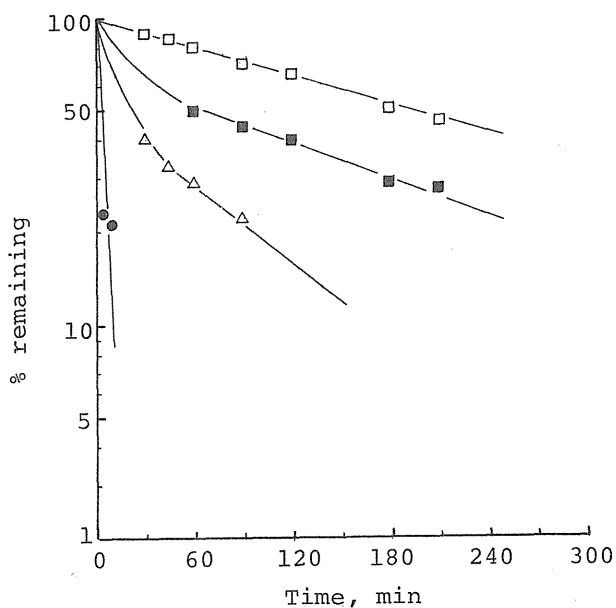


Fig. 33 Decomposition of ACNU in Aqueous Solution at 50° C
 (□) pH 4, (■) pH 5, (Δ) pH 6, (●) pH 7.

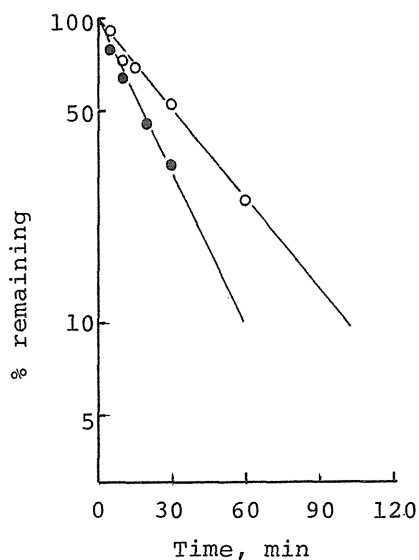


Fig. 34 Decomposition of ACNU and Me-CCNU
in Plasma at 37° C
(●) ACNU; (○) Me-CCNU

TABLE V Decomposition of ACNU and Me-CCNU
in Ethyl Oleate at 37° C

Time (d)	Percent of Unchanged Substance	
	ACNU	Me-CCNU
0	100.0	100.0
1	94.1 ± 0.2	74.8 ± 3.9 *
7	71.7 ± 10.1	64.1 ± 17.5

* Results are expressed as mean ± S.E.

ル中での安定性を示しているが、ACNUもMe-CCNUも非常に安定であり、7日後においても多量の薬物が分解せずにオレイン酸エチル中では残存していた。このように薬物を安定なまま油滴に封入し、病巣まで運搬できれば薬物の分解物による副作用をある程度防止でき、さらに効力を最大限に発揮できる可能性がある。この意味からも、標的性を有する磁性エマルジョンは脂溶性制癌剤の薬物担体として有用であると思われる。

第 2 節 磁性エマルジョンからの薬物放出

磁性エマルジョンは病巣部位において分散相に含有された薬物が放出されるように設計されている。そこで、Me-CCNUあるいはACNUを含有した磁性エマルジョンからの *in vitro* における薬物放出挙動をvisking チューブを用いた透析法で試験した。実験に用いたエマルジョンの組成はTable VI に示す。

Table VI Composition of Magnetic Emulsion

O/W Emulsion	
Water phase	4.0 ml
Casein	40 mg
Buffer solution (pH 8.0)	q.s.
Oil phase	1.0 ml
(Anticancer agent)	30 mg
Magnetites	209 mg
Ethyl oleate	q.s.
Total volume	5.0 ml

Fig.35はオレイン酸エチル系磁性エマルジョンからのACNUの放出を経時的に測定した結果である。放出挙動は未変化体を定量することで調べたが、前節の結果から明らかにようにニトロソウレアは生理的pHでは不安定であるため、透析チューブの外側の溶媒はpH4の緩衝液を使用して分解による影響を少なくして行なった。ACNUの放出パターンはまず急激に多量の薬物放出が生じ、120分までに約20%の含有薬物が放出され、その後は非常にゆっくりとした速度で放出がなされた。これはACNUが完全に油相に溶解していなかったためとACNUの溶解度がpH4ではかなり高いということに起因すると考えられる。

Fig.36は同様にMe-CCNUの放出を測定したものである。Me-CCNUは油滴にほぼ完全に溶解しているために放出量は少なかったが、6時間で65.7 μ gを見掛け上放出して徐放性の放出パターンを示した。

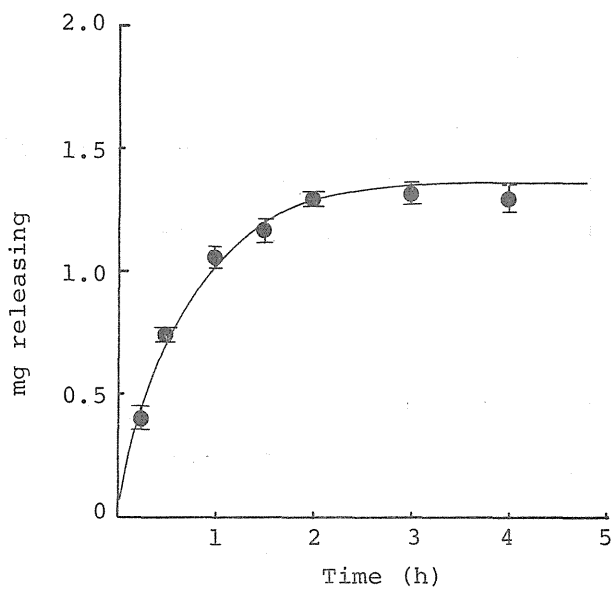


Fig. 35 *In Vitro* Release of ACNU from Magnetic Emulsions

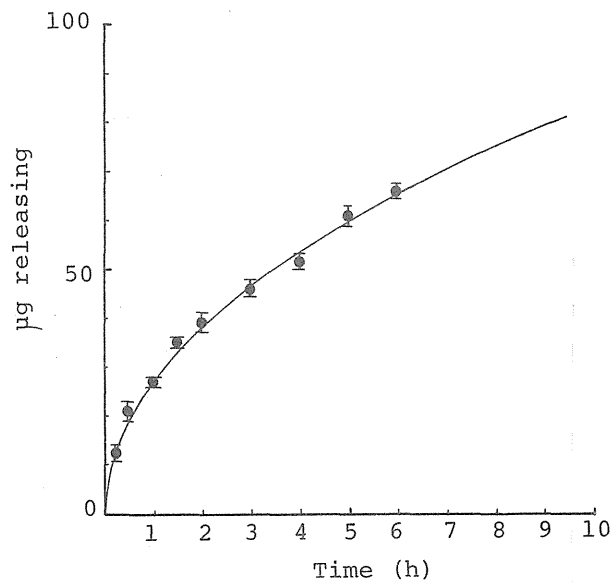


Fig. 36 *In Vitro* Release of Me-CCNU from Magnetic Emulsions

第2章 磁性エマルジョンによる抗腫瘍効果

癌の化学療法においては、腫瘍部位で薬物が有効量存在し、しかも長時間有効な薬物レベルを維持することが必要である。既存の制癌剤で有効なものはいくつかあるが、そのままでは正常組織への副作用、癌病巣への到達性の不足あるいは到達後の持続性の不十分などのため効力が十分に発揮されないのが現状である。²²

脂溶性のある薬物の場合はエマルジョンの油滴内に分布して、これが油滴のキャリアーとともにある特定の体内組織に蓄積されることが考えられる。S. Liungberg らは極めて脂溶性の高いチオペンタールをこのような剤形として静脈内注射すると催眠時間を延長することを報告した。⁷¹ これは脂肪組織などに沈着した油滴とともに薬物も貯留され、その後、徐々に薬物が血中に放出されるために中枢における睡眠時間の延長をきたしたものである。制癌剤としては同じく高脂溶性のCCNUが検討されている。胡麻油のエマルジョン、エタノール-ポリエトキシ化植物油エマルジョンなどが用いられ、肝臓、腎臓や肺などの組織で一定の高濃度が持続されると報告されている。⁵⁵

磁性エマルジョンの使用はこの分布をさらに選択的にしたものであり、もし薬物を含んだエマルジョンが標的臓器にのみ多量に取り込まれるならば、正常組織への副作用が軽減され、病巣部の治療だけを行なうことができる。

この見地にたって本章では標的部位における薬物濃度とAH7974転移肺癌に対する抗腫瘍効果の関係を述べ、制癌剤をより効果的に利用するための薬物担体として、磁性エマルジョンが制癌剤の標的性に対していかなる影響を及ぼすかについて考察した。⁶¹

第1節 標的部位における薬物濃度の測定

化学療法を行う場合は標的器官をまず癌の存在する部位に限定することが望ましいことは前にも述べた。そこで、磁場をラットの標的臓器に作成し、制癌剤含有磁性エマルジョン静脈内投与後の標的臓器（肺）内濃度を測定した。

Table VIIはMe-CCNU含有磁性エマルジョン投与後の肺内薬物量を磁石の有無に従って調べたものであるMe-CCNUの定量は臓器ホモジネートからのクロロホルム抽出後、Looらの比色定量法を用いて行なった。⁷¹ コントロールに比較して、磁石適用群は多量の薬物を肺内に保持していることが認められた。

Table VIII Methyl-CCNU Levels in the Lungs at 10 min following
Administration of a Single Dose of 1.5 mg in Magnetic
Emulsion Form

Magnetic flux density in gauss (G)	Methyl-CCNU levels (µg/g)
0 (control)	2.4 ± 0.4
2000	5.2 ± 1.1
6000	15.1 ± 2.2

* The magnet with a magnetic flux density of 6000 G
was placed at lungs and retained in position for 10 min.

ACNUは脂溶性と同時に水溶性も有し、その塩酸塩は静脈内注射が可能である。Fig.37及び38はACNU水溶液ならびに磁性エマルジョン投与後のACNU未変化体の生体内分布を高速液体クロマトグラフィー法（HPLC）で定量した結果を示している。水溶液投与10分後、肺には0.65 µg/g tissueのACNUが検出されたが、腎臓や脾臓中の濃度と比較すれば低濃度であった。また、肝臓や心臓及び血液中にもACNUは高濃度に存在し、標的臓器以外の正常組織でも相互作用があることを示唆していた。しかしながら、磁性エマルジョンとして静脈内投与すると、磁石適用のないグループでも肺に比較的高濃度に集中して、その他の臓器への分布量を低下させることができた。更に、磁石適用によって、この分布はさらに選択的となる傾向が認められ、排泄臓器である腎臓に低濃度で検出された以外、他の臓器中の未変化薬物量は微量で、そのほとんどがエマルジョン中に封入されて肺に集中したのではないかと考えられた。

また、投与60分後では水溶液投与群が腎臓以外での薬物の検出が難しかったのに対し、磁石適用を行った磁性エマルジョン投与群では依然として肺内での薬物濃度が高い傾向が認められた。しかし、60分後には他の臓器中の濃度も上昇していた。これは血流によるwashout効果によるものかも知れない。また、磁石適用群では6時間あるいは24時間経過後でも薬物を検出した動物も見られたことから、濃度依存性の殺細胞効果を有するニトロソウレアを標的部位に一定時間滞留させ、次いで油滴からの徐放性によって有効な薬物レベルを保持するのに磁性エマルジョンは有効ではないかと考えられた。

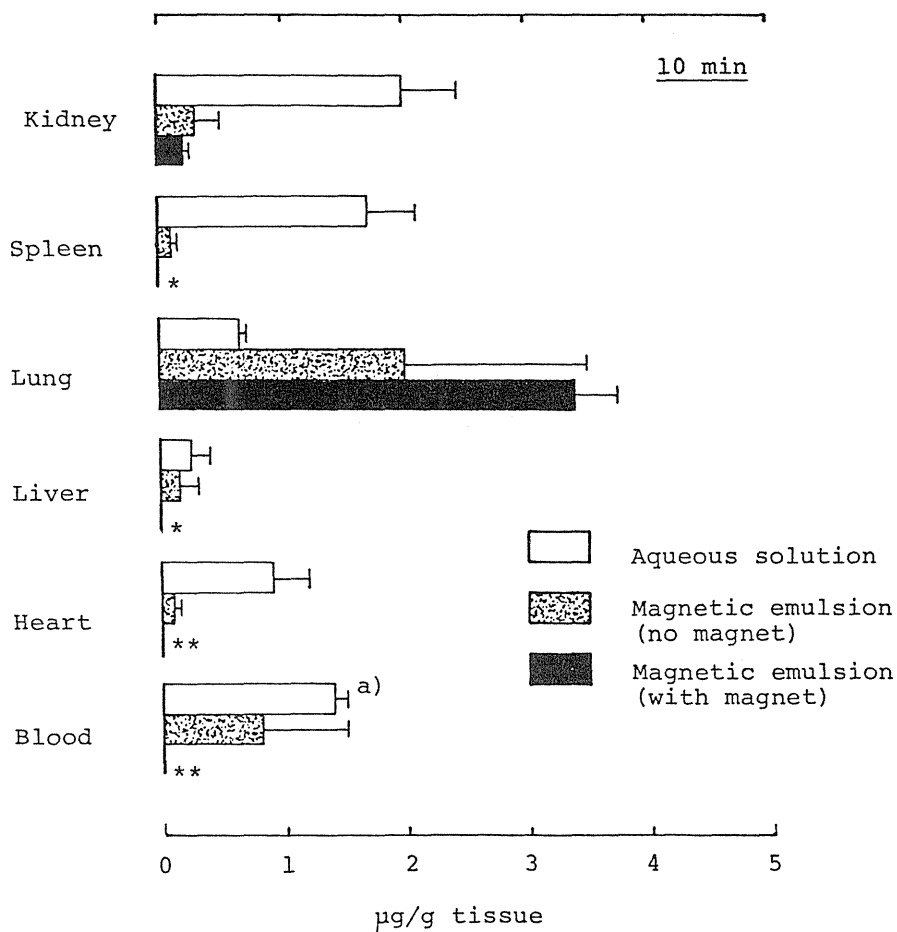


Fig. 37 Amount of ACNU in Various Organ after Intravenous Injection of Magnetic Emulsions at a Dosage of 10 mg/kg Body Weight with and without the Application of an Electromagnet
 a) µg/ml; * Not detected; ** Trace level.

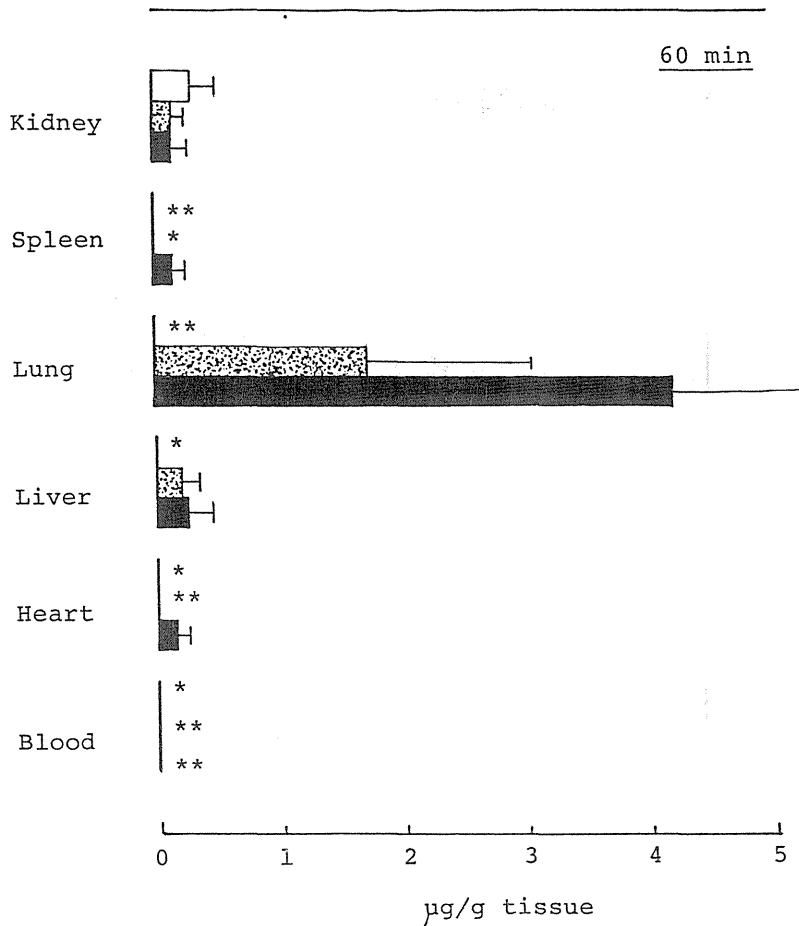


Fig. 38 Amount of ACNU in Various Organ after Intravenous Injection of Magnetic Emulsions at a Dosage of 10 mg/kg Body Weight with and without the Application of an Electromagnet
Columns and Captions; as in Fig. 37.

第2節 Me-CCNU含有磁性エマルジョンの 抗腫瘍効果

磁性エマルジョンはすぐれた磁気応答性および薬物保持能を有することが *in vitro* および *in vivo* において確認された。そこで、薬物含有磁性エマルジョンの癌化学療法への応用を目的として、AH7974転移肺癌に対する抗腫瘍効果について検討した。



Fig. 39

Photographs of AH 7974 Ascites Carcinoma (A), and AH 7974 Lung Carcinoma (B).

AH7974転移肺癌は体重 140—150g の雌性Donryuラットに作成した。作成法はAH7974腹水癌を尾静脈から投与することにより行なった。この腹水癌は主に2～3個の細胞が集合した状態となった、いわゆる島を形成しており、比較的細胞自体が堅いために、尾静脈注射するとほとんど肺にのみ浸潤増殖し、他の臓器への転移はほとんど見られないとされている。⁷³ Fig. 39 にそれぞれAH7974腹水癌細胞ならびにAH7974移植肺癌の組織切片写真を示す。

Fig.40およびTable VIIIはAH7974転移肺癌ラットを未処理、Me-CCNU懸濁液腹腔内投与、ならびにMe-CCNU含有磁性エマルジョン投与後、磁石処理したものと行なわなかったも

のに分けたときの生存日数を示している。磁石処理は磁束密度6000 Gで10分間、肺に磁力を適用した。未処理動物は接種後14～22日の間に死亡し、平均生存日数17.6日で懸濁薬物腹腔内投与群と有意な差は認められなかった。一方、Me-CCNU含有磁性エマルジョンを投与し、磁石処理した動物の平均生存日数は22.5日であり T/C %は128.1 %に増加した（ t -検定：磁性エマルジョン投与後磁石処理／コントロール、 $P > 0.01$ ）。また、磁石処理しなかった動物では113.2 %であり、磁石適用の効果が認められた（磁性エマルジョン投与後磁石処理／磁性エマルジョン投与、磁石未処理、 $P > 0.05$ ）。

第3節 ACNU含有磁性エマルジョンの抗腫瘍効果

Fig.41ならびにTable XIはACNU含有磁性エマルジョンの抗腫瘍効果について示したものである。ACNU水溶液投与群の平均生存日数は18.0日であり、コントロールに対する生存日数増加率T/C %は102.3 %であったが、磁性エマルジョンを静脈注射してから磁石を10分間適用すると生存日数は23.1日に増加し、T/C %が131.3 %となった（ t -検定）磁性エマルジョン投与後磁石処理／コントロール、 $P > 0.01$ ）。しかしながら、磁石適用を受けなかつた動物でもT/C %が125.6 %を示した。磁石適用群と適用を受けなかつた群との間に差があまりなかつたのは、ACNUのエマルジョンからの放出からもわかるように薬物が磁性液中に完全に溶解していないで、かなりの薬物が懸濁状態にあるため、肺に保持されたエマルジョンから比較的短時間のうちに多量の放出が生じたためかも知れない。磁性エマルジョンは磁石処理がなされなくても比較的多量が肺に集中するので、このような現象が観察されたと考えられ、放出性の大きい懸濁型エマルジョンでは磁石の効果が少ないように考えられた。

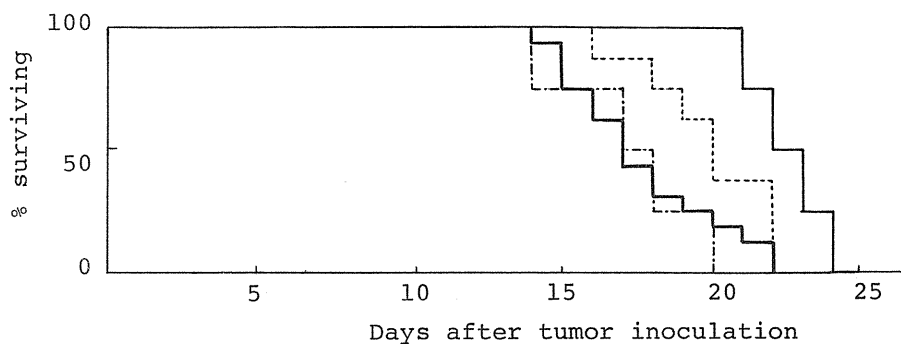


Fig. 40 Effect of Magnetic Emulsions containing Me-CCNU on the Survival of Rats Intravenous Inoculated with AH 7974 Cells

————— ; control, - - - - - ; drug suspension
 ; magnetic emulsion (no magnet)
 — · — · — ; magnetic emulsion (with magnet)

Table VIII Effect of Treatment with Various Formulations of Methyl-CCNU on Survival Time of Rats Bearing AH 7974 Lung Carcinoma

Formulations	Number of rats	Mean survival time \pm S.E. (days)	T/C% ^{a)}
Control ^{b)}	16	17.6 \pm 2.6	100
Methyl-CCNU-Suspension ^{c)}	8	17.3 \pm 2.3	98
Methyl-CCNU-Magnetic emulsion (no magnet)	8	19.9 \pm 2.2	113
Methyl-CCNU-Magnetic emulsion (with magnet)	8	22.5 \pm 1.2	128

a) The ratio of the mean survival time of the treated group (T) to that of the control group (C).

b) Control group had no chemotherapy.

c) Intraperitoneal injection.

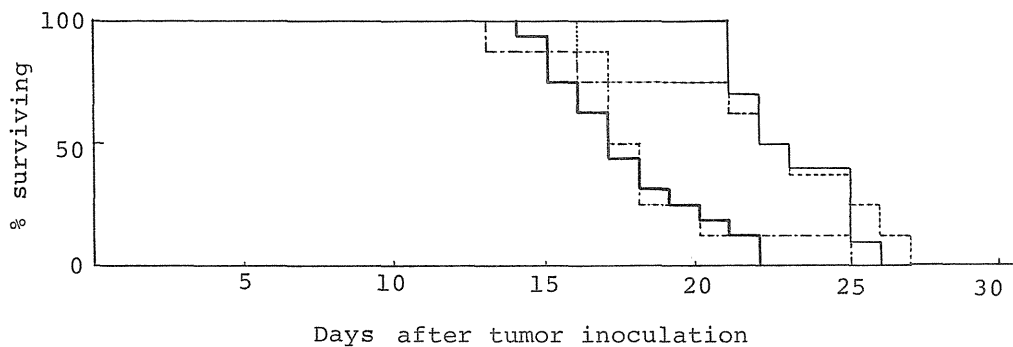


Fig. 41 Effect of Magnetic Emulsions Containing ACNU on the Survival of Rats Intravenous Inoculated with AH 7974 Cells

————; control, - - - - -; free drug
; magnetic emulsion (no magnet)
 — · — · —; magnetic emulsion (with magnet)

Table IX Effect of Treatment with Various Formulations of ACNU on Survival Time of Rats Bearing AH 7974 Lung Carcinoma

Formulation	Number of rats	Mean survival time \pm S.E. (days)	T/C% ^{a)}
Control	16	17.6 \pm 2.6	100
ACNU-Aqueous solution	8	18.0 \pm 1.2	102
Magnetic emulsion ^{b)} (with magnet)	5	17.2 \pm 1.3	98
ACNU-Magnetic emulsion (no magnet)	8	22.1 \pm 1.4	126
ACNU-Magnetic emulsion (with magnet)	10	23.1 \pm 0.3	131

^{a)} See Table VIII.

^{b)} This formulation was not contained chemotherapeutic agents.

第4節 磁性エマルジョンの毒性

磁性エマルジョンの毒性はエマルジョン自体の毒性というよりマグネタイトの毒性が問題である。そのほか、乳化剤や磁気毒性の問題もあるが、乳化剤や界面活性剤はエマルジョンの調製に適していて、安全性の高い医療用界面活性剤、アミノ酸系界面活性剤や高分子物質などを選択し、調製条件や用途などに応じて使い分けることは可能であるので支障はないと考えられる。また、磁気毒性であるが、生物学的な Ferromagnetic mineral magnetite を体内に有する小動物（鳩）やバクテリアなどの帰巢能力や方向性に強い磁力が影響すると云われているが、⁷⁴人体などの生体組織に対しては通常得られる局所的強磁場は組織障害性を持たないと云われ、磁気そのものが生体に与える影響についてはむしろ否定的であり短時間であれば殆んど影響を受けないと考えられている。⁵⁴

マグネタイトや磁性粉末の毒性は数多く検討されている。巨理らはフェライト造影剤をddI マウスに連日経口投与して長期間毒性を検討したが体重減少は顕著に観察されず、むしろバリウム造影剤の方が副作用が大きかった。⁴⁴戸部らも経口投与による急性毒性および亜急性毒性試験を行ったが、いずれも特異な症状はなく、一般症状も死亡率も対照群と比較して大きな差はなかった。⁷⁵加藤らはラット腹腔内に磁粉を注入して観察したが毒性を認めなかったと報告している。⁷⁶また、フェライト造影剤の血管内注入では肺閉塞を始めとする血管閉塞が生じることがラットなどの実験からわかった。⁴⁴それは投与量にも関係し、少量なら副作用を見ないし、大量でも家兎など大動物であれば障害は認められなかったが、これらの実験はまだ報告が少なく、今後検討されなければならない。著者もオレイン酸系の磁性エマルジョンの静脈内投与時に、肺閉塞を生じたラットをいくつか認めたが、オレイン酸エチル系の磁性エマルジョン（0.25ml）の一回投与では肺閉塞などの副作用を全く認めなかった。これは先に示したフェライトなどに比較するとマグネタイトの粒子径が $100 \sim 150 \text{ \AA}$ と小さく、またエマルジョンであるため低粘度で、しかも磁気応答性がすぐれているためマグネタイト量が少ない（ $< 9 \text{ mg}$ ）ことに起因している。更に、AH7974転移肺癌ラットに薬物を含まない磁性エマルジョンを尾静脈注射したが、その生存日数はコントロールと比較してほとんど変化がなかった。

X線透視下でカテーテルを挿入し、病巣の支配動脈まで誘導するのは容易であると考えられている。⁷⁷これらの方法を利用すれば血栓系などへの影響を最小にした投与が可能である。既に、Alksneらはヒトの脳動脈瘤の塞栓療法をカルボニル鉄を使って試みているが、その際毒性は殆んど観察できなかったと報告している。⁴⁶磁性エマルジョンもこの様な投与方法を用いることで副作用をかなり防止できると思われる。

第5節 考 察

エマルションの *in vitro* での安定性と *in vivo*での薬剤運搬能力とは強い関連性を持つと云われている。¹⁸ 脂溶性制癌剤をオレイン酸エチルで包み込んだ形の血管注入可能なo/w型磁性エマルションは薬剤運搬能力および安定性共に優れた剤形である。そのうえ、水溶液ならびに生体液中で非常に安定性の低いニトロソウレアを保護、安定化するのにも有効であった。高橋らはエマルション微小油滴内に溶解したMe-CCNUが優れた制癌効果を発揮することを報告している。⁷⁰ この際のエマルション中の制癌剤の安定性は不明であるが、制癌効果は油脂のもつ徐放性とエマルションのもつ組織浸透性が加味された結果であるとしている。

著者はオレイン酸エチル中でのニトロソウレアの安定性が良好であること (Fig.30～33およびTable V)、またオレイン酸エチルで調製した磁性エマルションからのニトロソウレアの放出には徐放性のあること (Fig.35)を確認した。更に、磁性エマルションがAH7974転移肺癌に有効であるという知見も得た (Fig.40およびFig.41)。しかも投与経路が尾静脈であり、局所注入の非常に難しい臓器癌に対して効果があることが認められた。しかしながら、延命効果 (T/C %) は 130%程度と低く、決して十分満足のいくものではなかった。これは薬物を含んだ磁性エマルションが最初、肺に保持されても肺内血流のwashout 効果などの影響を受けるため、十分な時間保持することが難しく、濃度依存性のニトロソウレア系制癌剤の有効濃度を一定時間作用させることが難しかったことに起因すると考えられる。この点に関しては、さらなる磁気感应性と安定性の高いエマルションと高磁場を発生させることが可能な電磁石の開発が必要であり、技術的には達成可能なことと思われる。また、ニトロソウレアはAH7974細胞に対して感应性の高い制癌剤はないことも原因の一つであるかも知れない。癌化学療法において、この薬剤感受性の問題は重要で、多剤併用や投与順序など殺細胞効率上研究報告も多い。^{79, 80}

今回調製した磁性は脂溶性制癌剤の封入が可能であり、ニトロソウレアに限らず他の制癌剤の封入による制癌効果の検討が必要とされるが、エマルションの型をw/o/w型の多相エマルション (multiple emulsion) にすることにより水溶性制癌剤を封入して腫瘍部位へ伝送することも理論的には可能である。⁵⁹

これまで述べてきた実験結果より、磁性エマルションが制御可能な薬物伝達システムとして十分利用できる可能性を有するものであることが明らかとなったが、さらに臨床応用に向けて磁気誘導の増強が必要と思われる。

結 論

オレイン酸エチルをベースとして調製した磁性エマルションは安定であり、*in vitro* よび *in vivo*においても優れた磁気応答性を示すことが認められた。更に、脂溶性制癌剤の封入も可能で分解を受け易いニトロソウレアなどの保護、安定化にも有効であることが判明した。動物実験からエマルション中に封入した薬物の有効性は確認され、磁性エマルションは薬物担体として有用であることが認められた。

これらの結果から、磁性エマルションは薬物担体として外科手術時の補完療法における術前投与や腫瘍部位に対する微小血管塞栓療法など病巣部位の人工的な硬塞の形成や選択的な制癌剤の転送等に臨床応用が期待できると考えられる。

謝 辞

本研究に際して終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました城西大学森本雅憲助教授に衷心より深甚なる謝意を表わします。更に本研究に際し種々の有益な御助言を戴いた岐阜薬科大学加藤好夫名誉教授ならびに城西大学杉林堅次博士に深謝します。また、磁性液の調製に御協力戴いたタイホー工業中央研究所四元義憲氏に感謝すると共に、実験の一部に御協力戴いた製剤学教室諸氏に厚くお礼申し上げます。

実験の部

第 1 編 実験の部

〔 I 〕 オレイン酸エマルションの調製法

(1) 試 料

オレイン酸、ゼラチン（アルカリ処理）およびカゼインは和光純薬工業、牛血清アルブミン（BSA、Fraction V）はSigma 社の製品を用い、その他の試薬はすべて特級品を用いた。

(2) 調 製 法

o/w 型エマルションは分散相にオレイン酸を使用し、分散相濃度は20%（v/v）とした。連続相は1%（w/v）タンパク質溶液（BSA、ゼラチンおよびカゼイン）として、pH 3.0 - 9.0 にイオン強度0.1 の等張緩衝液で調節した。

分散相（2 ml）を連続相（8 ml）に加え、Ultra Turrax（Hanke & Kunkel Co., Ltd.）を使って10000 回転、5 分間乳化した。乳化はすべて37℃の水浴上で行なった。

〔 II 〕 オレイン酸エマルションの安定性の評価法

エマルションの安定性は調製直後から視覚的観察、粒子径および粒子数の測定、表面張力、粘度およびタンパク質の吸着量の測定などの面から評価した。すべての実験において、測定温度は37℃で行なった。

(1) 相分離過程の比較

エマルションの安定性はクリーミングの過程から評価した。調製後エマルションをすばやくガラス管中に移し、密栓した後、ガラス管の下層に現われる排液の高さを経時的に測定した。^{23 24 28 30}

(2) 油滴の粒子径および粒子数の測定

エマルションの粒子径および粒子数はコールターカウンター（Model ZB, Coulter

Electronics Co., Ltd. Florida. U.S.A.)によって測定した。測定には50 μm のアパーチャーチューブを用い、電解質には0.9 %食塩水を使用した。

(3) 表面張力の測定

連続相の表面張力は Du Nouy型表面張力計 (Tombo Borl Co., Ltd. Japan) を使用して測定した。⁸¹

(4) 粘度の測定

連続相およびエマルションの粘度は毛細管粘度計 (ウベローデ型、草野科学器械) を用いて測定した。

また、エマルションのレオロジカルな性質は回転粘度計 (Potovisco、RV100/CV100型、Haake、Germany) を使用し、ずり速度 0 から180 sec^{-1} の間で測定を行った。⁸²⁻⁸⁴

(5) タンパク質とオレイン酸との相互作用

油水界面に吸着するタンパク質の量を Lowryらの方法に従って定量した。⁸⁵

まず、0.1 % (w/v) のタンパク質溶液を調製し、その8 mlを50mlの遠心管に移した。オレイン酸 (2 ml) を加え、密栓した後、激しく攪拌してo/w型エマルションを製した。10分間攪拌した後、3000回転で10分間遠心し、上清の油分を除去した。水層1 mlをピペットで試験管に移し、水層中のタンパク質濃度を定量してエマルション生成前の水相中の濃度との差から吸着量を推定した。⁸⁶

〔Ⅲ〕 磁性液の調製法³⁸

(1) 試 料

硫酸第1鉄および硫酸第2鉄は和光純薬工業の製品を用いた。また、その他の試薬はすべて特級品を使用した。

(2) 調 製 方 法

- 1) 0.67M硫酸第1鉄溶液 (150 ml) および1.00M硫酸第2鉄溶液 (100 ml) を混和し、数分間攪拌した。
- 2) 250g/l水酸化ナトリウム溶液 (128 ml) を加えて中和した。この時、反応温度は35°C前後に維持した。
- 3) 攪拌後、さらに水酸化ナトリウムを滴下してpHを11-12として、その後約20分

間攪拌し続けた。

- 4) 15%オレイン酸ナトリウム(60ml)を添加した後、ガスバーナーで加熱した。反応温度は80℃以上を維持し、約30分間攪拌加熱を行なった。
- 5) 冷後、1 N塩酸を滴下してpHを5.5 に調節した。その後、蒸留水を多量に加えて希釈し、デカンテーションによって水を除去した。
- 6) 洗浄後、吸引ろ過してから凍結乾燥して磁性粉末を得た。
- 7) 磁性粉末はオレイン酸またはオレイン酸エチルに分散させて、磁性液とした。

〔Ⅳ〕 磁性エマルションの調製法

(1) 試 料

マグネタイト(Fe_3O_4 微粉末)およびオレイン酸エチルベースの磁性液の一部はタイホー工業株式会社から供与された。その他の試薬はすべて特級品を使用した。

(2) 調 製 方 法

分散相としてオレイン酸ベースの磁性液またはオレイン酸エチルベースの磁性液を用い、連続相に1%カゼイン溶液(pH 8.0)を使用したこと以外は〔Ⅰ〕の(2)の方法に従った。

〔Ⅴ〕 磁性エマルションの安定性の評価法

(1) 沈降容積の測定

磁性エマルションの分散相の沈降体積を指標に安定性を検討した。調製後すばやくエマルション試料をメスシリンダーに移し、37℃で経時的に沈降した体積を測定した。

(2) 粒子径および粒子数の測定

〔Ⅱ〕の(2)の方法を準用して測定を行なった。

(3) 密度の測定

密度は精密密度計(Anton Paar Co., Germany)を使用し、37℃で蒸留水およびメタノールを標準物質として測定を行なった。

(4) 粘度の測定

〔Ⅱ〕の(4)の方法に従って測定した。

第2編 実験の部

〔Ⅰ〕 磁性エマルシヨンの磁気応答性^{14 56}

磁気応答性を有するエマルシヨン(0.5 ml)を1.0 %カゼイン溶液(10ml)を満したシャーレ底部にディスク状永久磁石(Edmund Scientific、No. 30730、サマリウムコバルト製、内径5 mm、外径9.5 mm、厚み6 mm)を適用して、その連続写真から経時的变化の観察を行なった。

〔Ⅱ〕 磁性エマルシヨンの生体外磁気誘導法の検討

(1) 実験装置(血管モデル)

磁性エマルシヨンの誘導に用いた血流モデル装置は Fig.42 に示す。血管を想定したシリコンチューブ内は pH7.4等張緩衝液を定量ポンプ(RF型、東京理科器械)で流動させた。流速は電磁石内に位置しているガラス管(内径6 mm、長さ30cm)中で15cm/sec(100 ml/min)とした。電磁石は日本電磁測定器製で、ポール径25mm、ギャップ可変方式(0~5 cm)、60 V、10 Aで6000 Gの出力を有する。実験中の磁場の強さをチェックするために使用したガウスメーターは横河電機製(3251型)のものである。なお、電磁石は連続使用では発熱するため水冷式にした。

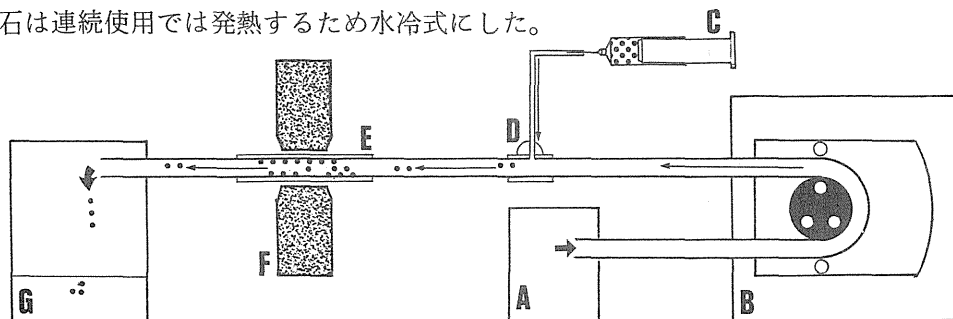


Fig. 42 A Constant-Flow Apparatus used to Measure the Magnetic Responsiveness of the Emulsions
(A) Phosphate buffer; (B) Flow pump; (C) Syringe; (D) Introduction chamber; (E) Glass tube; (F) Electromagnet; (G) Container.

(2) 実験方法

磁性エマルジョン (0.5 ml) は緩衝液が流動するシリコンチューブ内に注入器(D) から注入された。エマルジョンは油滴を ^{14}C -パルミチン酸で標識化したものと未標識のもの二種類を用意し、それぞれ磁場に保持された油量とマグネタイトの量を測定した。なお、磁束密度は 500 G - 6000 G の間で変化させ、磁力と保持量の関係を調べた。

(3) マグネタイトの定量法

ガラス管内の場を集積したエマルジョンはビーカー内に集められ、マグネタイトは濃硫酸と塩酸によって溶解された。それを蒸留水によって希釈した後、試料 (10 μl) を原子吸光分光分析装置 (日本 JARREL-ASH Co., AA-8200) を使用して測定した。なお、この際の鉄原子の吸収波長は 3720 Å を使用した。

(4) 油量の測定 (^{14}C -パルミチン酸の定量法)

ガラス管内の磁場を集積した磁性エマルジョンを濃硫酸と濃塩酸によって完全に溶かし、蒸留水によって 5 ml に希釈した。それにトルエン 10 ml を加えて密栓し、振盪器 (板垣理科、MS-1 型) によって 10 分間振盪後、3000 rpm、5 分間遠心分離した。有機層 8 ml をピペットで TRITON X-100 を含んだシンチレーター (Table X) 10 ml の入ったシンチレーションバイアルに取り、その放射活性を液体シンチレーションカウンター (Aloka、LSC-703) で測定した。その時、水層 1 ml も同時に採取し、脱脂綿を入れたコンバストコーン内に入れてデシケーター中で乾燥後、自動燃焼装置 (Aloka、モデル ASC-111) で燃焼後、液体シンチレーションカウンターで測定した。全放射活性は有機層ならびに水層の体積に関して算出した。

Table X にトルエン系のシンチレーターの組成を、また自動燃焼装置に用いたシンチレーターならびに捕集液は Table XI に示す。

Table X Composition of Liquid Scintillator
for In Vitro Experiments

Triton X-100	500 ml
Toluene	1000 ml
POPOP	0.25 g
PPO	8.25 g

Table XI Composition of Liquid Scintillator
for In Vivo Experiments

Trap for $^{14}\text{CO}_2$	
Monoethanolamine	600 ml
Methanol	400 ml
$^{14}\text{CO}_2$ -Scintillator	
Methanol	450 ml
Toluene	550 ml
PPO	6.0 g
POPOP	0.3 g

(5) 実 験 結 果

上記のように測定した結果をTable XII に示す。

Table XII Retention of Magnetic Emulsion Flowing Isotonic Phosphate
Buffer as a Function of a Magnetic Flux Density

Magnetite					
	500 G	1000 G	2000 G	4000 G	6000 G
Oleic Acid	2.8 ± 1.1	3.2 ± 1.4	9.2 ± 2.7	16.1 ± 10.3	33.8 ± 10.3
Ethyl Oleate	6.5 ± 2.7	12.4 ± 3.9	20.0 ± 4.0	33.6 ± 7.5	33.0 ± 4.5
^{14}C -Palmitic Acid					
	500 G	1000 G	2000 G	4000 G	6000 G
Oleic Acid	4.1 ± 1.4	15.2 ± 6.1	18.9 ± 7.4	19.9 ± 6.8	21.2 ± 4.6
Ethyl Oleate	1.7 ± 0.2	8.0 ± 1.7	13.4 ± 2.0	23.9 ± 1.1	30.8 ± 3.8

(% of initial value)

Results are expressed as the mean \pm S.E. of 3-4 experiments.

〔Ⅲ〕 磁性エマルジョンの生体内分布測定法

(1) 試 料

^{14}C -パルミチン酸 (New England Nuclear) は日本ラジオアイソトープ協会から購入した。また、ペントバルビタールナトリウムは大日本製薬のネンブタール[®]を使用した。

(2) 実 験 動 物

実験には体重約 150 g の雌性Donryuラットを用いた。ラットは $24 \pm 1^\circ\text{C}$ の温度環境で飼育され、飼料 (オリエンタル酵母) と水は自由に与えた。

(3) 電磁石によるラット肺への磁性エマルジョン磁気誘導法

ラットをペントバルビタールナトリウム (60 mg/kg i.p.) で麻酔し、電磁石 (ギャップ 2 cm) の間にラットの肺がくるように固定した。次に ^{14}C -パルミチン酸で標識化した磁性エマルジョン 0.2 ml を尾静脈内に投与した。電磁石は投与前に 2000-6000 G の磁場を発生させておき、投与後 10 分ないしは 60 分間適用した。電磁石の写真を Fig. 43 に示す。

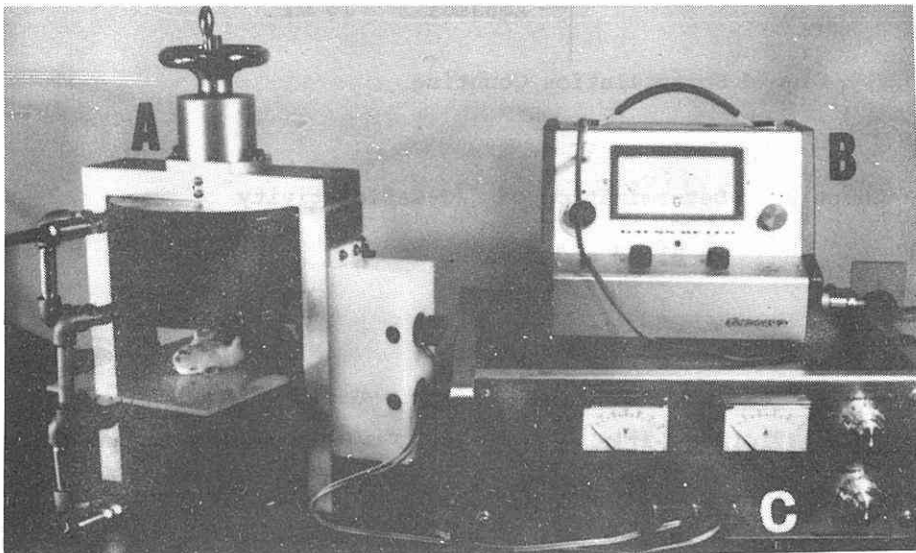


Fig. 43 Apparatus for Guiding Magnetic Emulsions to Target Site
(A) electromagnet; (B) gauss meter;
(C) power supply.

(4) 臓器中の放射活性の定量

磁性エマルジョン投与10分あるいは60分後、ラットは断首脱血によって殺してから腎臓、脾臓、肺、肝臓および心臓を摘出、さらに血液1 mlをも採取し、その放射性活性を測定した。

次に、この定量法について述べる (Chart 2)。

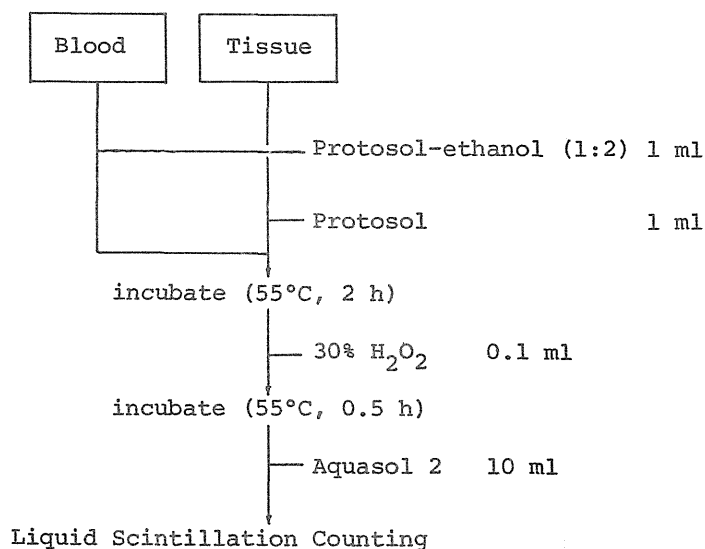


Chart 2 Determination of ^{14}C -Radioactivity
in Blood and Tissues

- 1) 摘出した臓器の重量を計り、その100 mgにプロトソール (New England Nuclear) 1 mlを加えて栓をし、55°C、2時間インキュベートした。また、血液についてはプロトソール-エタノール混液 (1:2)を加えて同様にインキュベートした。
- 2) 次に、30%過酸化水素水の0.1 mlを加え、栓をゆるめて再びインキュベート (55°C、30分間)した。
- 3) 冷後、アクアゾール 2 (New England Nuclear)を10ml加え、2 ~ 3度振盪してから一晩暗所に放置した。
- 4) 放射活性は液体シンチレーションカウンターで計測した。

(5) 実験結果

磁性エマルジョンならびにオレイン酸エマルジョンの臓器分布の結果をTable XIII~XVに示す。

Table XIII Tissue Distribution of ^{14}C -labeled Oleic acid-based Magnetic Emulsions at 10 and 60 min after Intravenous Injection

	0 (control)		2000 G	
	10 min	60 min	10 min	60 min
Kidney	0.9 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.2 ± 0.2	1.1 ± 0.2
Spleen	1.4 ± 0.3	1.7 ± 0.1	0.9 ± 0.2	1.1 ± 0.3
Lung	3.0 ± 0.6	3.6 ± 0.9	8.7 ± 1.8	4.5 ± 1.0
Liver	6.1 ± 0.9	7.1 ± 0.7	4.7 ± 0.3	4.6 ± 0.2
Heart	0.9 ± 0.1	1.1 ± 0.4	1.1 ± 0.4	1.0 ± 0.4
	4000 G		6000 G	
	10 min	60 min	10 min	60 min
Kidney	1.2 ± 0.1	1.4 ± 0.2	0.8 ± 0.1	1.1 ± 0.1
Spleen	1.2 ± 0.5	1.5 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.2
Lung	11.9 ± 1.3	8.4 ± 4.9	11.4 ± 2.0	8.4 ± 1.9
Liver	5.1 ± 1.9	5.5 ± 0.3	3.9 ± 0.1	5.1 ± 0.3
Heart	1.8 ± 0.2	1.1 ± 0.1	1.6 ± 0.4	1.3 ± 0.4

Results are expressed as the mean \pm S.E. of 3-4 experiments.

(Radioactivity; % of dose/g tissue)

Table XIV Tissue Distribution of ^{14}C -labeled Ethyl Oleate-based
Magnetic Emulsions at 10 and 60 min after Intravenous Injection

	0 (control)		2000 G	
	10 min	60 min	10 min	60 min
Kidney	1.5 ± 0.4	1.2 ± 0.2	1.8 ± 0.4	1.0 ± 0.2
Spleen	2.2 ± 0.2	1.9 ± 0.3	1.6 ± 0.3	1.3 ± 0.1
Lung	16.8 ± 1.7	8.1 ± 1.5	28.9 ± 5.5	10.7 ± 1.0
Liver	5.2 ± 0.8	6.4 ± 0.6	4.3 ± 0.4	3.6 ± 0.3
Heart	1.1 ± 0.1	1.4 ± 0.3	2.0 ± 0.4	1.2 ± 0.1
	4000 G		6000 G	
	10 min	60 min	10 min	60 min
Kidney	2.0 ± 0.3	1.4 ± 0.3	2.0 ± 0.3	1.4 ± 0.2
Spleen	1.5 ± 0.3	1.7 ± 0.2	1.5 ± 0.3	1.8 ± 0.2
Lung	32.5 ± 3.7	9.6 ± 1.1	32.7 ± 3.7	10.8 ± 1.3
Liver	3.1 ± 0.5	4.9 ± 1.1	4.0 ± 0.3	4.2 ± 0.2
Heart	1.9 ± 0.5	1.7 ± 0.2	1.2 ± 0.2	1.8 ± 0.5

Results are expressed as the mean \pm S.E. of 6-7 experiments.

(Radioactivity; % of dose/g tissue)

Table XV Tissue Distribution of radioactivity
10 and 60 min after Injection of
o/w Emulsion Containing ^{14}C -Palmitic
Acid through the Tail Vein

	10 min	60 min
Kidney	0.9 ± 0.2	0.8 ± 0.1
Spleen	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1
Lung	2.6 ± 0.2	2.6 ± 0.7
Liver	5.6 ± 0.3	3.3 ± 0.3
Heart	1.0 ± 0.1	0.6 ± 0.1

(% of dose/g tissue)

Results are expressed as the mean \pm S.E.

of 3 experiments.

[Ⅳ] マグネタイトの分布に関しての組織学的検討法^{87 88}

実験〔Ⅱ〕の(3)と同様にDonryuラットの肺に磁石を適用してから尾静脈内より磁性エマルジョン(0.25ml)を投与した。投与後10分にラットを断首脱血によって殺し、ただちに肺と肝臓を摘出した。摘出した肺と肝臓は生理食塩水を満したビーカー中に浸し、デシケーター内に入れた。真空ポンプによって臓器は30分間脱気した後、組織切片の作製を行なった。固定染色法は固定→包埋→切片化→染色→封入の順に行なった(Chart 3)。

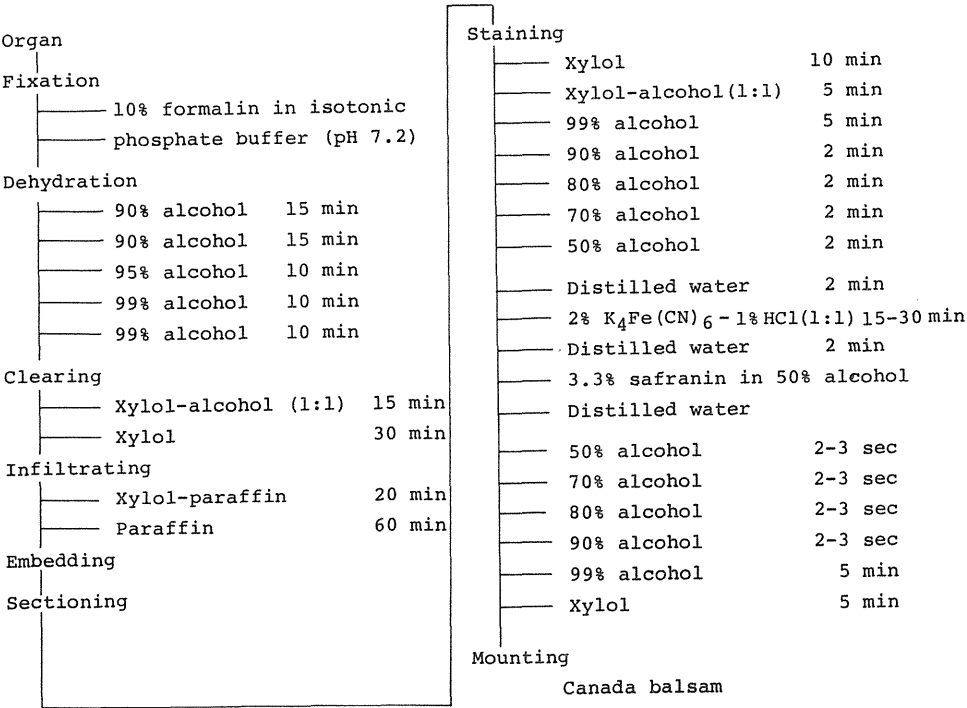


Chart 3 Specimen Preparation Procedure for Photomicroscopy

次にプレパラートの作製手順について述べる。

- ① 固定……………固定瓶に10%ホルマリン等張緩衝液（pH 7.2）を入れ、そこに臓器を4～5 mmに切って入れ固定した。
- ② 包埋……………最初に臓器をアルコールに入れて徐々に脱水を行なった。次にキシロールを加えアルコールを追い出し組織を透明にした後、キシロールをパラフィンに置き換えて組織をパラフィンに包埋した。
- ③ 切片化……………パラフィンブロックから組織片を切り出し、これをミクロトームの台木固定装置に固定した。4 μ m の厚さの切片を得るように調節し、リボン状に切れた組織片が得られたなら、卵白アルブミンを塗布したスライドグラス上に伸展した。
- ④ 染色……………組織中のパラフィンを取り除くためキシロールとアルコールにより脱パラフィン操作を行なった。フェロシアン化カリウム・塩酸混液（1：1）中で15～30分間染色を行ない、水洗した。再びアルコールで脱水、キシロールで透徹した。
- ⑤ 封入……………カナダバルサムを染色切片上に落とし、カバーガラスによって封入を行なった。

〔染色結果〕

鉄は青藍色に、核は赤色に染色された。

第3編 実験の部

〔I〕 ニトロソウレアの安定性の測定

(1) 試 料

Me-CCNU, 1-(2-chloroethyl)-3-(4-methyl-cyclohexyl)-1-nitrosourea は共和発酵から、ACNU 1-(4-amino-2-methyl-5-primidinyl)-methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea・HCl は三共製薬から供与された製品を使用した。

(2) 実 験 法 (水溶液)

ACNU は水酸化ナトリウム溶液を用いてベース (遊離塩基) を調製した。ACNU および Me-CCNU はあらかじめエタノール溶液を予製した。pH 4 ~ 8 の等張緩衝液あるいは希塩酸溶液 (pH 2) 中に ACNU あるいは Me-CCNU を加えて、インキュベートした。温度は 37°C あるいは 50°C に調節した。経時的に水溶液 2 ml を採取して定量した。

(3) 実 験 法 (血 清)

薬物を家兔血清 (バイオテスト研究所) 20 ml に溶解し、37°C でインキュベートした。経時的に血清 1 ml を採取してクロロホルム 4 ml と振盪した。2000 rpm で遠心分離した後、有機層 3 ml を取り、水溶上で蒸発乾固した。残渣に酢酸緩衝液 (pH 4.0) 2 ml を加え、必要に応じメンブランフィルター (東洋、 $\phi = 0.2 \mu\text{m}$) で濾過して定量した。

(4) 実 験 法 (オレイン酸エチル)

薬物をオレイン酸エチル中に溶解し、 $2 \sim 4 \text{ mg/ml}$ 程度の濃度に調製した。50 μl の試料を経時的に採取して 5 ml のメタノール 5 ml と混和した後、その 0.2 ml を 2 ml の酢酸緩衝液 (pH 4.0) と混合した。メンブランフィルターで濾過後、試料 2 ml を定量した。

(5) 定 量 法

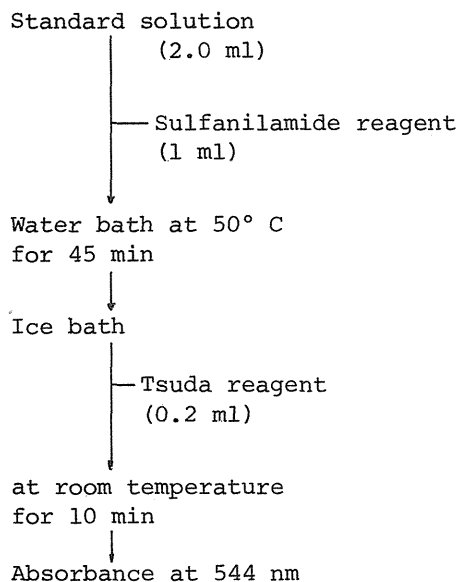


Chart 4 Determination of ACNU
or Methyl-CCNU

(6) 実 験 結 果

以下に測定結果を示す。

ACNUは紫外部244 nm、Me-CCNUは230 nmにそれぞれ最大吸収波長をもつため、直接水溶液をその波長で測定できる。⁶⁹⁾

しかしながら、この方法は感度が低いため、低濃度の定量にはLooらの比色定量法を用いた。Chart 4 に定量法のフローチャートを示す。

まず、薬物を含んだ水溶液2 mlにスルファニルアミド試薬(5 mg /ml) 1 mlを加えて、50°Cで45分間インキュベートした。氷冷後、津田試薬0.2 mlを添加し、室温に10分間放置した後、分光光度計(日立、100-60型)で544 nmの吸光度を測定した。

Table XVI Stability of Methyl-CCNU: First Order Rate and Half-Life Periods

pH	Medium	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	$K \times 10^3 \text{ min}^{-1}$	$t_{1/2}, \text{min}$
2.0	0.01N HCl	4.78	37	3.27	212
2.0		8.19	50	8.67	80
4.0	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ and Na_2HPO_4	4.64	37	3.21	216
4.0		8.57	50	9.06	77
5.0	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ and Na_2HPO_4	4.60	37	3.47	200
5.0		8.29	50	10.70	69
6.0	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ and Na_2HPO_4	4.66	37	4.43	156
6.0		7.73	50	14.51	48'
7.0	KH_2PO_4 and NaHCO_3	5.00	37	10.70	69*
7.0		8.25	37	18.40	38
7.0		5.84	50	51.10	14
8.0	KH_2PO_4 and Na_2HPO_4	4.93	37	20.00	29*
8.0		7.53	37	43.80	16
8.0		3.60	50	118.00	6

* Direct spectrophotometric measurement of absorbance at 230 nm.

Table XVII Stability of ACNU: First-Order Rate and Half-Life Periods

pH	Medium	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	$K \times 10^3 \text{ min}^{-1}$	$t_{1/2}, \text{min}$
2.0	0.01N HCl	10.71	37	1.20	578
2.0		8.44	50	3.87	179
4.0	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ and Na_2HPO_4	10.37	37	1.01	686
4.0		8.72	50	2.48	279
5.0	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ and Na_2HPO_4	10.04	37	2.34	296
5.0		8.84	50	7.04	98
6.0	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ and Na_2HPO_4	10.31	37	7.23	96
6.0		8.84	50	9.67	72
7.0	KH_2PO_4 and NaHCO_3	6.92	37	222.34	3
7.0		6.42	50	238.80	3
8.0	KH_2PO_4 and Na_2HPO_4	7.53	37	291.34	2
8.0		6.71	50	292.20	2

〔II〕 磁性エマルジョンからの薬物放出量の測定

(1) 薬物含有磁性エマルジョンの調製

ACNUあるいは Me-CCNU をオレイン酸エチルベースの磁性液に溶解または懸濁させて、濃度 30 mg/ml としたものを分散相として、第 1 編実験の部〔IV〕の(2)の方法に従って調製した。

(2) 磁性エマルジョンからの薬物放出速度測定法

磁性エマルジョンからの薬物放出は透析膜 (36/32, Visking Co., Ltd.) を使った平衡透析法によって決定した。実験装置は Fig.44 に示す。薬物を含有した磁性エマルジョンは調製後すみやかに透析膜の内側に入れた (内液)。

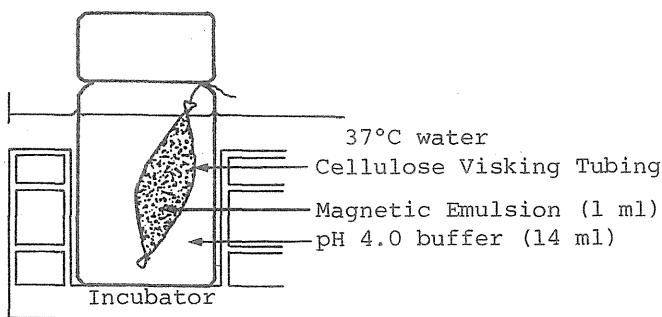


Fig. 44 Apparatus used to Study the Release of Nitrosourea from Magnetic Emulsions

膜の外側には最もニトロソウレアの安定性の良い溶媒である酢酸緩衝液 (pH4.0) を加えた (外液)。内液および外液ともに温度を 37°C とし、インキュベーター (池田理科、1B-100 型) によって振盪 (100 Strokes/min) した。

試料 1 ml を外液から経時的に採取し、容積を一定に保つために緩衝液 1 ml を加えた。また透析膜への薬物の吸着は無視した。

(3) 定 量 法

外液中の薬物濃度の定量は〔I〕の(5)の方法に従って行なった (Chart 4 参照)。

〔Ⅲ〕 Me-CCNU の肺内濃度測定法

(1) Me-CCNU含有磁性エマルジョンの調製

本編〔Ⅱ〕の(1)項に記述した。

(2) 実験法

肺 1 g 当りに生理食塩水 4 mlを加えてホモジネート (1300rpm、5 分間) し、その 2 mlにクロロホルム 5 mlを加えて振盪した。

振盪後、遠心分離 (3000rpm、5 分間) を行ない、上清を捨てた。有機層 3 mlを採取して蒸発乾固させてから、エタノール 0.2mlおよび酢酸緩衝液 (pH4.0)を順に加えた後にメンブランフィルターで濾過した。濾液 2 mlを試料として薬物の定量を行なった。

(3) 定量法

本編〔Ⅰ〕の(5)項の方法を準用した。

〔Ⅳ〕 ACNU の生体内濃度測定法

(1) ACNU含有磁性エマルジョンの調製

本編〔Ⅰ〕の(1)項に記載した。

(2) 実験法

体重 140～150 g の雌性 Donryu ラットに ACNU 10 mg/kg に相当する量を水溶液あるいは磁性エマルジョンとして尾静脈より投与した。肺を標的臓器として電磁石を磁束密度 6000 G で 10 分間適用した。投与後 10 分、60 分、6 時間および 24 時間に血液、腎臓、脾臓、肺、肝臓および心臓を採取した。

(3) 血液からの ACNU の抽出法

Chart 5 に抽出法を示す。50 ml の栓付遠心管に血液 1 ml、内部標準液、ISTD (2-phenylbenzimidazole, 0.4 mg/50 ml in 0.001N HCl、Aldrich) 0.5 ml およびジクロロメタン (DCM) 15 ml を加えて 2 分間振盪した。次に、2500 rpm で 5 分間遠心分離を行ない、上清を吸引して捨てた。有機層を芒硝にて脱水し、10 ml の有機層を試験管に移した後、ジェットエアバーボライザー[®] (石井商店) を用い室温、窒素気流下で溶媒を蒸発乾固させた。残渣は -10℃ で冷凍保存した。

(4) 臓器からのACNUの抽出法

Chart 6 に抽出法を示す。試料臓器は生理食塩水で洗浄し濾紙で水分を吸い取った後に秤量した。臓器 1 g に対して等張緩衝液 (pH 7.4) 2 ml と 0.25 ml の内部標準液 (ISTD) を加えて Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーによってホモジネート (1300 rpm, 5 分間) を調製した。それにジクロルメタン (DCM) 20 ml を加えて振盪後 2500 rpm, 5 分間遠心分離した。上清を吸引して捨てた後、有機層に芒硝を加えて脱水し、15 ml の溶媒を窒素気流によって揮発乾固させて残渣を得た。同様に残渣は -10°C で冷凍保存した。

(5) 定量法 (HPLC法)

残渣にエタノール 0.2 ml を加えてミキサー (大洋科学、S-5 型) で混合した後、0.1N 塩酸 0.5 ml を加えた。試料液はメンブランフィルター (Toyo Roshi、TM-4) で濾過してから、その 25 μl を高速液体クロマトグラフィーによって定量した。⁷²

以下にHPLC法の詳細について述べる。

(i) 試料

- ① 移動相……………1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム (東京化成) 1 g を 2% 酢酸溶液に溶解し 500 ml とした後、メタノール 500 ml と混和して全量 1000 ml として用いた。
- ② 内部標準液…2-phenylbenzimidazole (Aldrich) を内部標準として、その 0.4 mg を 0.001N 塩酸に溶解して全量を 50 ml として使用した。
- ③ 抽出溶媒……………1,2-ジクロルメタン (和光純薬) を蒸留して使用した。
- ④ その他……………メタノールは蒸留したものを使用し、他に使用した試薬はすべて特級品を用いた。

(ii) 測定方法

測定機器はポンプ・コントローラーユニットに日立製作所製の 635-S 型、検出器に応用分光 Uvilog-5 III、積分計は Hewlett Packard 社製、3390 A を使用した。分離にはプレカラム (30 \times 4.6 mm) および逆相カラム (250 \times 4.6 mm) を使用した (PR-8、Braunlee Lab. Inc. および Nucleosil 5C₁₈、Nergel)。測定条件はカラム内圧 200 kg/cm²、流速 1 ml/min で、チャースピードは 1 mm/min とした。ピーク高さ法 (UV, 244 nm, AUFS 0.04) で定量し、その定量限界は約 50 ng/g (ml) であった。

次に、各種試料のクロマトグラムを Fig. 45 に示す。

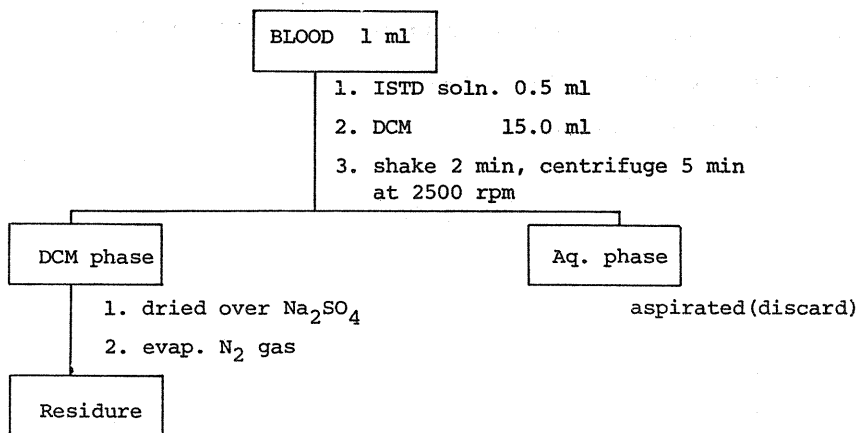


Chart 5 Procedure for the Extraction of ACNU from Blood

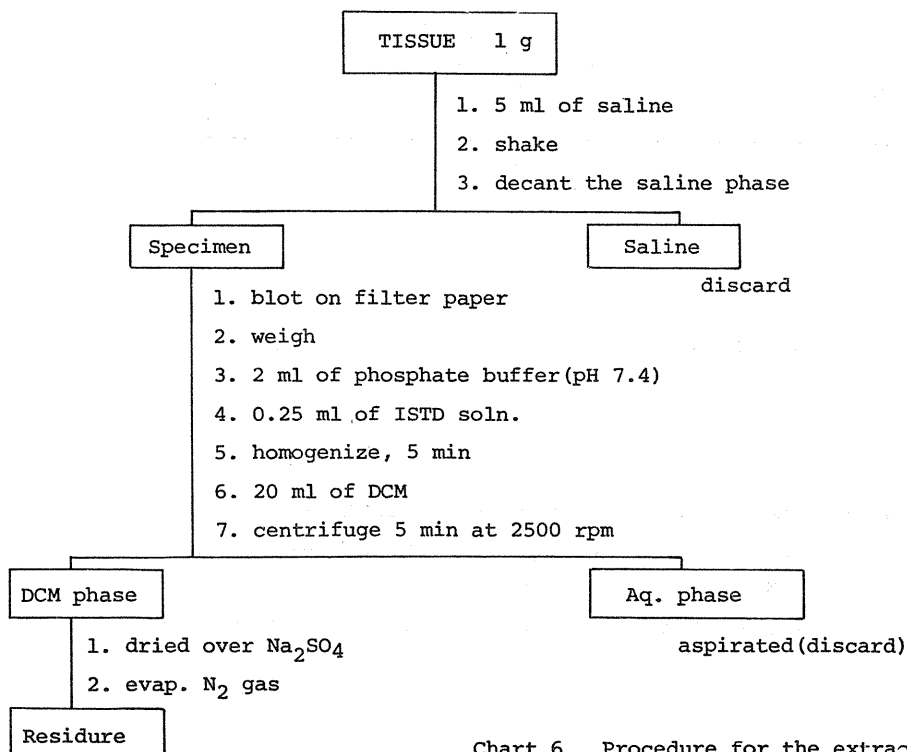
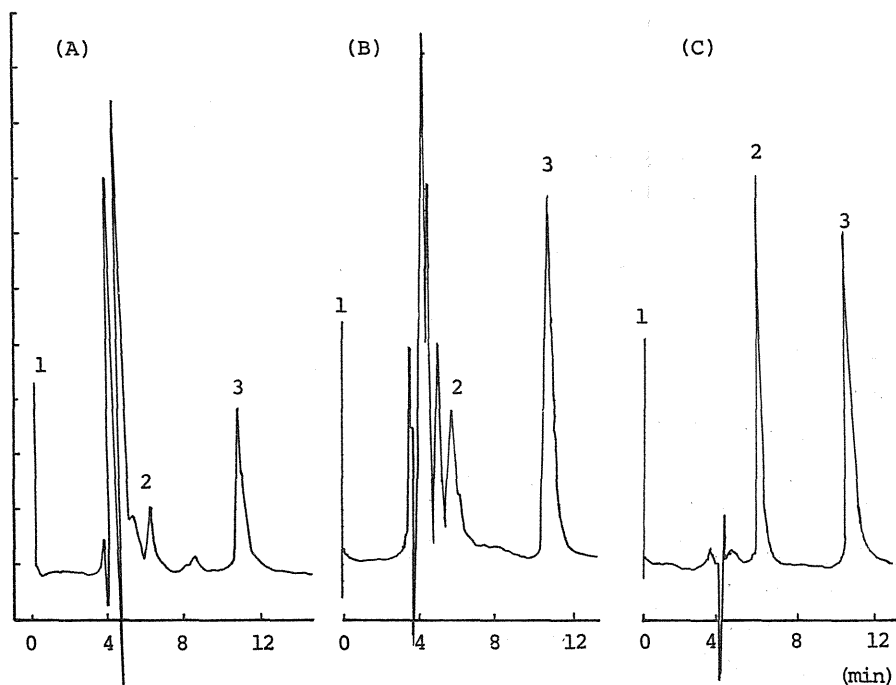


Chart 6 Procedure for the extraction of ACNU from tissue

Fig. 45. High-Performance Liquid Chromatograms of (A) Tissue (Spleen),
(B) Blood and (C) Standard solution.

1. injection 2. ACNU 3. ISTD



(iv) 計 算 法

生体試料中のACNU濃度は次の式から算出した。

$$C = R / m \quad \dots\dots (\text{eq. 2})$$

where, R = peak height ratio (ACNU/Internal standard)

m = slope of the calibration curve obtained by
the least square method

C = concentration of ACNU in specimen, $\mu\text{g/g}$ or $\mu\text{g/ml}$.

実 験 結 果

実験結果は Table XVIII に示す。

Table XVIII Amount of ACNU in Various Organ after Intravenous Injection of Magnetic Emulsions *

10 min	Aqueous Solution	Magnetic Emulsion (no magnet)	Magnetic Emulsion (with magnet)
Kidney	1.96 ± 0.23**	0.28 ± 0.24	0.16 ± 0.04
Spleen	1.68 ± 0.65	0.06 ± 0.03	N.D.
Lung	0.65 ± 0.05	2.03 ± 1.58	3.39 ± 0.29
Liver	0.23 ± 0.18	0.06 ± 0.02	N.D.
Heart	0.90 ± 0.28	trace	trace
Blood	1.38 ± 0.08***	0.80 ± 0.75	trace

10 min	Aqueous Solution	Magnetic Emulsion (no magnet)	Magnetic Emulsion (with magnet)
Kidney	0.27 ± 0.23	0.16 ± 0.13	0.20 ± 0.16
Spleen	trace	trace	0.14 ± 0.11
Lung	trace	1.69 ± 1.40	4.40 ± 3.48
Liver	N.D.	0.06 ± 0.02	0.17 ± 0.11
Heart	N.D.	trace	0.12 ± 0.10
Blood	N.D.	trace	trace

* Results are expressed as the mean ± S.E. of 3-4 experiments.

** µg/g *** µg/ml

〔 V 〕 抗腫瘍効果測定法

(1) 実験動物

実験動物は雌性 Donryu ラット、体重 140～ 150 g のものを使用した。AH7974腹水癌（佐々木研究所より供与されたもの）の移植は希釈しない 10^7 個の腫瘍細胞を含む約 0.2 ml の腹水を約 7 日毎に移植して継代した。

(2) AH7974転移肺癌ラットの作成法

転移肺癌は無麻酔ラットの尾静脈からAH7974腹水癌細胞 3×10^7 個を含む腹水を投与して作成した。

(3) 磁性エマルジョンの磁気誘導法

AH7974腹水癌細胞尾静脈内投与後24時間に、ラットをペントバルビタールナトリウム (60 mg/kg i.p.) で麻酔し、電磁石の間に肺がくるように固定した。次に、薬物含有磁性エマルジョン 0.2 ml を尾静脈内投与した。投与量はACNUおよび Me-CCNU で10 mg/kgとした。なお、電磁石は投与前に6000 G の磁場を発生させておき、投与後10分間適用した。

(4) 肺癌ラットに対する磁性エマルジョンの効果の検討 (Me-CCNU)

磁性エマルジョン (0.2 ml) の投与後、磁性処理を行なった群と行なわなかった群、Me-CCNUを0.2 % polysorbate 80生理食塩水に懸濁して腹腔内投与した群および何らの処理も施さなかった群 (コントロール) に分けてその生存日数を比較した。

(5) 肺癌ラットに対する磁性エマルジョンの効果の検討 (ACNU)

磁性エマルジョン (0.2 ml) 投与動物の磁石処理群と未処理群、ACNU水溶液尾静脈内投与群およびコントロール群の4群に関して生存日数を調べた。

参考文献

- 1) ファルマジア' レビュー No. 6, "がん制圧の化学", 日本薬学会, 1981.
- 2) C.G.Zubrod, Proc. Nat. Acad. Sci., 69, 1042(1972).
- 3) 古 江 尚, "抗癌剤の投与法", 薬局, 30, 31(1979).
- 4) G.Gregoriadis (ed.), "Drug Carrier in Biology and Medicine," Academic Press, Inc., London, 1979.
- 5) G.Gregoriadis, Nature (London), 265, 407(1977).
- 6) B.C.F.Chu and J.M.Whitley, Molecular Pharmacology, 13, 80(1977).
- 7) R.J.Juliano and D.Stamp, Biochem. Pharmacol., 27, 21(1978).
- 8) a) K.A.Kramer, J. Pharm. Sci., 63, 1646(1974).
b) K.Sugibayashi, Y.Morimoto, T.Nadai and Y.Kato, Chem. Pharm. Bull., 25, 3433(1977).
- 9) A.Trouet, D.D.Campeneer, M.D.Smedt-Malengreaux and G.Attassi, Europ. J. Cancer, 10, 405(1974).
- 10) Mitsuru Hashida, Yoshiteru Takahashi, Shozo Muranishi and Hitoshi Sezaki, J. Pharmacokin. Biopharm., 5, 241(1977).
- 11) G.Gregoriadis and B.E.Ryman, Europ. J. Biochem., 24, 485(1972).
- 12) K.J.Widder, A.Senyei and D.Scarpelli, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 58, 141(1978).
- 13) Y.Morimoto, K.Sugibayashi, M.Okumura and Y.Kato, J. Pharm. Dyn., 3, 264(1980).
- 14) Y.Morimoto, M.Okumura, K.Sugibayashi and Y.Kato, J. Pharm. Dyn., 4, 624(1981).
- 15) C.R.Alving, I.Schneider, G.M.Swartz and E.A.Steck, Science, 205, 1142(1979).
- 16) G.Gregoriadis, D.E.Neerunjun and R.Hunt, Life Sci., 21, 357(1977).
- 17) M.Hashida, S.Muranishi, H.Sezaki, N.Tanigawa, K.Satomura and Y.Hikasa, Inter. J. Pharm., 2, 245(1979).
- 18) M.Hashida, T.Yoshioka, S.Muranishi and H.Sezaki, Chem. Pharm. Bull., 28, 1009(1980).
- 19) P.Sherman (ed.), "Emulsion Science," Academic Press, London, 1969.
- 20) M.Akimoto and Y.Morimoto, J. Pharm. Dyn., 5, s-15.
- 21) M.Akimoto and Y.Morimoto, Biomaterials, *in press*.
- 22) 村 西 昌 三, "癌化学療法の生物薬剤学", 薬局 29, 57(1978).
- 23) S.Noro, A.Takamura and M.Koishi, Chem. Pharm. Bull., 27, 309(1979).

- 24) A.Takamura, T.Minowa, S.Noro and T.Kubo, Chem. Pharm. Bull., 27, 2921(1979).
- 25) A.Takamura, S.Noro, T.Minowa and M.Koishi, Chem. Pharm. Bull., 28, 696(1980).
- 26) E.S.Lower, Drug and Cosmet. Ind., 116, 54(1975).
- 27) 中村 幹雄, 井川 喜富, 小畑 繁雄, 薬剂学 40, 151(1980).
- 28) C.J.Cante, R.W.Franzen and F.Z.Saleeb, J. AM. OIL CHEMISTS' SOC., 56, 71A(1979).
- 29) 金谷 昭子, Nippon Nogeikagaku Kaishi, 53, 401(1979).
- 30) T.Mita, K.Yamada, S.Matsumoto and D.Yonezawa, J. Texture Stud., 4, 41(1973).
- 31) D.D.Crenwelge, C.W.Dill, P.T.Tybor and W.A.Landmann, J. Food Sci., 39, 175(1974).
- 32) Hand Book "Drug & Cosmetic Materials" p.133, 日光ケミカルズ(株), 1977.
- 33) F.Z.Saleeb, C.J.Cante, T.K.Streckfus and J.R.Frost, J. AM. OIL CHEMISTS' SOC., 52, 208(1975).
- 34) A.M.Pearson, M.E.Spooner, G.R.Hegarty and L.J.Bratzler, Food Technol., 19, 103(1965).
- 35) 松村 雄介, マシンデザイン, 1977, 77.
- 36) 下飯坂 潤三, 中塚 勝人, 表面 13(2), 103(1975).
- 37) R.Kaiser and G.Miskolczy, J. Appl. Phys., 41, 1064(1970).
- 38) 下飯坂 潤三, 中塚 勝人, 中鉢 良治, 佐藤 惟陽, 日化, 1976, 6.
- 39) Y.Morimoto, M.Akimoto and Y.Yotsumoto, Chem. Pharm. Bull., 30, 3024(1982).
- 40) a) J.S.Tempio and J.L.Zatz, J. Pharm. Sci., 69, 1209(1980).
b) I.W.Kellaway and N.M.Najib, Inter. J. Pharm., 9, 59(1981).
- 41) Y.Kita, S.Matsumoto and D.Yonezawa, J. Colloid Interface Sci., 62, 87(1977).
- 42) K.Mosbach and U.Schroder, FEBS Lett., 102, 112(1979).
- 43) R.S.Molday, S.P.S.Yen and A.Rembaum, Nature, 268, 437(1977).
- 44) 亘理 勉, 渡辺 哲敏, 磁性体の医学への応用シンポジウム, 東京, 1970年2月.
- 45) 山田 竜作, 佐藤 守男, 三島 隆生, 代謝 19, 癌'82, 233(1982).
- 46) J.F.Alsksne, A.Fingerhut and R.Rand, Surgery, 60, 212(1966).
- 47) K.Sugibayashi, M.Akimoto, Y.Morimoto, T.Nadai and Y.Kato, J. Pharm. Dyn., 2, 350(1979).
- 48) Y.Morimoto, M.Akimoto, K.Sugibayashi, T.Nadai and Y.Kato, Chem. Pharm. Bull., 28, 3087(1980).

- 49) K.Sugibayashi, Y.Morimoto, T.Nadai, Y.Kato, A.Hasegawa and T.Arita, Chem. Pharm. Bull., 27, 204(1979).
- 50) Y.Morimoto, K.Sugibayashi and Y.Kato, Chem. Pharm. Bull., 29, 1433(1981).
- 51) A.W.Segal, G.Gregoriadis and C.D.V.Black, Clin. Sci. Molec. Med., 49, 99(1975).
- 52) 村 西 昌 三, , 薬学雑誌, 100, 687(1981).
- 53) T.Yoshioka, M.Hashida, S.Muranishi and H.Sezaki, Inter. J. Pharm., 8, 131(1981).
- 54) a) 加 藤 哲 郎、根 本 良 介、森 久、佐 藤 貞 幹、岩 田 克 夫
加 藤 隆 三、海 野 勝 男、後 藤 昭 雄、天 野 保 二、原 田 昌 興
本 間 基 文、岡 田 益 男、美濃輪 武 久、人 工 臓 器、9, 327(1980).
b) 加 藤 哲 郎、根 本 良 介、森 久、岩 田 克 夫、阿 部 良 悦
海 野 勝 男、後 藤 昭 男、室 田 英 行、越 後 真知子、本 間 基 文
人工臓器、9, 1124(1980).
- 55) C.L.Litterst, E.G.Mimnaugh, A.C.Colles, T.E.Gram and A.M.Gualino J. Pharm. Sci., 63, 1718(1974).
- 56) Y.Morimoto, K.Sugibayashi and M.Akimoto, Chem. Pharm. Bull., *in press*.
- 57) Y.Mizushima, T.Hamano and K.Yokoyama, J. Pharm. Pharmacol., 34, 49(1982).
- 58) Richard C. Oppenheim, Inter. J. Pharm., 8, 217(1981).
- 59) L.A.Elson, B.C.J.Mitchley, A.J.Collings and R.Schneider, Rev. Europ. Clin. et Biol., 15, 87(1970).
- 60) L.T.Lomankiw and N.Y.Briachift, U.S. Patent, 3981844(1975).
- 61) Y.Morimoto, M.Akimoto and K.Sugibayashi, Chem. Pharm. Bull., *in preparation*.
- 62) A.E.Senyei, S.D.Reich, C.Gonczy and K.J.Widder, J. Pharm. Sci., 70, 389(1981).
- 63) K.J.Widder, R.M.Morris, G.Poore, D.P.Howard and A.E.Senyei, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 579(1981).
- 64) 加 藤 哲 郎、根 本 良 介、森 久、日癌治誌、15, 967(1980).
- 65) K.Sugibayashi, M.Okumura and Y.Morimoto, Biomaterials, 3, 181(1982).
- 66) 花 野 学、藤 田 浩、栗 津 莊 司、 “ 薬の体内動態 ”、講談社、(1981).
- 67) 森 照 明、峯 浦 一 喜、片 倉 隆 一、脳神経、31, 601(1979).
- 68) Y.Morimoto, M.Akimoto and K.Sugibayashi, Yakuzaigaku, *in preparation*.

- 69) T.L.Loo, R.L.Dion, R.L.Dixon and D.P.Rall, J. Pharm. Sci., 55, 492(1966).
- 70) 高橋俊雄、山口俊晴、藤原光、田中淳一、水口直樹
河野研一、癌と化学療法、8, 101(1981).
- 71) T.L.Loo and R.L.Dion, J. Pharm. Sci., 809(1965).
- 72) K.Nakamura, M.Asami, K.Kawada and K.Sasahara, Ann. Rep. Sankyo Lab., 29, 66(1977).
- 73) 佐藤博、市村宏子、日本臨床, 29, 170(1971).
- 74) M.F.Barnothy (ed.), "Biological effects of magnetic fields", Vol. 2, Plenum press (New York), 103(1969).
- 75) 戸部満寿夫、小林和雄、鈴木幸子、池口良雄、磁気の医学への応用シンポジウム、埼玉県理化学研究所、1972年4月
- 76) 加藤哲郎、癌と化学療法、8, 696(1981).
- 77) E.K.Lang, Radiology, 98, 391(1971).
- 78) 市村宏子、癌と化学療法、2, 605(1975).
- 79) 佐藤博、ファルマシア、14, 219(1978).
- 80) T.Takahashi, S.Ueda, K.Kono and S.Majima, Cancer, 38, 1507(1976).
- 81) J.C.Acton and R.L.Saffle, J. Food Sci., 35, 852(1970).
- 82) J.C.Acton and R.L.Saffle, J. Food Sci., 36, 1118(1971).
- 83) G.H.Galugaru, R.Badescu and E.Luca, Rev. Roum. Phys., 21, 305(1976).
- 84) Y.Morimoto, Y.Yamaguchi and K.Sugibayashi, Chem. Pharm. Bull., 30, 2980(1982).
- 85) O.H.Lowry, N.J.Rowenbrough and R.J.Rancill, J. Biol. Chem., 193, 265(1951).
- 86) R.Cecil and C.F.Louis, Biochem. J., 117, 139(1970).
- 87) 岡本耕造、"顕微鏡的組織化学"、第2版、医学書院.
- 88) V.Babes, Z. Wiss. Mikr., 4, 470(1887).